

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 mai 2003 (15.05.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/040299 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C12N

(74) Mandataire : CABINET ORES; 36, rue de St. Petersbourg, F-75008 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR02/03555

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :

17 octobre 2002 (17.10.2002)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

01/13352 17 octobre 2001 (17.10.2001) FR

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33 rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR). SEDAC THERAPEUTICS [FR/FR]; Parc Eurasanté, Le Galénis - Bâtiment B, 85 rue Nelson Mandela, F-59120 Loos (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MAILLERE, Bernard [FR/FR]; 1 Promenade Vénétia, F-78000 Versailles (FR). CASTELLI, Florence [FR/FR]; 17/19 rue Paul Bert, F-92120 Montrouge (FR). BUHOT, Cécile [FR/FR]; 76 rue de Choisy, F-94400 Vitry-sur-Seine (FR). GEORGES, Bertrand [FR/FR]; 36 Clos de la Ferme, F-59221 Bauvin (FR).

(54) Title: METHOD OF SELECTING HLA-DP4 LIGANDS AND THE APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre : PROCEDE DE SELECTION DE LIGANDS D'HLA-DP4 ET SES APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to a method of selecting HLA-DP4 ligand molecules comprising the following steps: (i) incubation of purified HLA-DP4 with a tracer having general formula (I) $Z_1X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9Z_2$ (wherein Z_1 and Z_2 , which may be identical or different, are equal to zero or each represent a peptide with between 1 and 100 amino acids; X_6 represents an aromatic or hydrophobic amino acid or a cysteine; and X_1 represents an aromatic or hydrophobic amino acid and/or X_9 represents an aromatic or hydrophobic amino acid or C, D, Q, S, T or E; and X_2, X_3, X_4, X_5, X_7 and X_8 each represent an amino acid) in the presence of different concentrations of molecule(s) to be tested; (ii) separation of the different complexes formed; (iii) detection of HLA-DP4/peptide tracer complexes; and (iv) selection of ligand molecules having a binding capacity $IC_{50} < 1000$ nM. The invention also relates to the applications of same.

WO 03/040299 A2

(57) Abrégé : Procédé de sélection de molécules ligand d'HLA-DP4 comprenant les étapes suivantes: (i) incubation d'HLA-DP4 purifiée avec un traceur de formule générale (I) $Z_1X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9Z_2$, dans laquelle: Z_1 et Z_2 , identiques ou différents, sont nuls ou représentent chacun un peptide de 1 à 100 acides aminés, X_6 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe ou bien une cystéine, et X_1 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe et/ou X_9 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe, ou bien C, D, Q, S, T ou E, et X_2, X_3, X_4, X_5, X_7 et X_8 représentent chacun un acide aminé, en présence de différentes concentrations de molécule(s) à tester, (ii) séparation des différents complexes formés, (iii) révélation des complexes HLA-DP4/peptide traceur, et (iv) sélection des molécules ligand qui présentent une activité de liaison $IC_{50} < 1000$ nM, et ses applications.

PROCEDE DE SELECTION DE LIGANDS D'HLA-DP4 ET SES APPLICATIONS

La présente Invention est relative à un procédé de sélection de ligands d'HLA-DP4 et à ses applications.

5 Les lymphocytes T CD4+ font partie des principales cellules régulatrices de la réponse immunitaire. Spécifiques des antigènes, ils sont en effet capables de reconnaître la présence d'un agent pathogène, d'un allergène ou d'une cellule tumorale et de déclencher une réponse immunitaire. La reconnaissance de ces antigènes conduit en effet à l'activation des lymphocytes T CD4+ qui sécrètent la plupart
10 des cytokines nécessaires au recrutement de cellules effectrices que sont les lymphocytes CD8+ cytotoxiques et les lymphocytes B producteurs d'anticorps. Les lymphocytes T CD4+ interviennent également dans l'activation des cellules par des contacts cellulaires et par exemple induisent l'activation, par la molécule CD40, des cellules dendritiques présentatrices de l'antigène. L'activation des lymphocytes T CD4+ est un
15 pronostic favorable lors des infections par des virus tels que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), les papillomavirus humains (HPV) ou le virus de l'hépatite C (HCV) et ces cellules apparaissent comme nécessaires à l'immunité anti-tumorale. Leur rôle n'est toutefois pas systématiquement bénéfique pour l'organisme. Les maladies autoimmunes résultent très souvent d'une activation incontrôlée de lymphocytes
20 T CD4+. C'est le cas de la sclérose en plaque et du diabète insulino-dépendant. Ces lymphocytes contribuent également à l'établissement des maladies allergiques. L'IL4, qui est principalement sécrétée par les lymphocytes T CD4+, est en effet le principal facteur qui conduit à la production d'IgE. Enfin, le rôle des lymphocytes T CD4+ dans le déclenchement du rejet de greffe est bien établi. Ainsi, selon la maladie, les traitements visent à déclencher l'activation des lymphocytes T CD4+ (vaccination contre un agent pathogène ou une cellule tumorale) ou à diminuer l'état d'activation des lymphocytes T CD4+ (désensibilisation contre l'allergie, prévention du rejet de greffe).

25

L'activation des lymphocytes T CD4+ se fait sous l'effet de la présentation de peptides antigéniques par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II que portent les cellules présentatrices d'antigène (APC pour *Antigen Presenting Cell*) ; chez l'homme, elles sont dénommées molécules HLA II pour *Human Leucocyte Antigen type II*. Ces peptides antigéniques, appelés épitopes T,

résultent de la dégradation protéolytique des antigènes par les cellules présentatrices d'antigène. Ils ont des longueurs variables, généralement de 13 à 25 acides aminés et possèdent une séquence qui les rend capables de se lier aux molécules HLA II. Il est bien connu qu'au même titre que l'antigène natif, un peptide épitope T est capable de 5 stimuler *in vitro* des lymphocytes T CD4+ qui lui sont spécifiques ou de les recruter *in vivo*. Il est donc suffisant pour induire une réponse T CD4+. D'une manière intéressante, on sait également que selon les modes de présentation (voie d'administration, doses, adjonction ou non d'un adjuvant), la reconnaissance de ces peptides entraîne soit une activation des lymphocytes T CD4+ (ALEXANDER et al., *J. Immunol.*, 2000, 10 164, 1625-1633 ; DEL GUERCIO et al., *Vaccine*, 1997, 15, 441-448 ; FRANKE et al., *Vaccine*, 1999, 17, 1201-1205), soit leur anergie (MULLER et al., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1998, 101, 747-754 ; OLDFIELD et al., *J. Immunol.*, 2001, 167, 1734-1739). Ces peptides épitopes T sont donc susceptibles à la fois de participer à la composition d'un vaccin ou de servir à diminuer l'activation non désirée de lymphocytes T CD4+. Ils sont également susceptibles de participer à un test de diagnostic de 15 l'état immunitaire de patients ou d'individus normaux reposant sur la détection directe (test de prolifération lymphocytaire) ou indirecte (production d'anticorps, de cytokines...) desdits lymphocytes T CD4+ activés.

Un des problèmes majeurs qui limite l'utilisation de ces peptides est 20 l'identification de ces épitopes, étant donné que leur séquence varie d'un individu à l'autre en raison du polymorphisme des molécules HLA II. En effet, les molécules HLA II sont des hétérodimères constituées d'une chaîne alpha (α) et d'une chaîne bêta (β) polymorphes. Il existe quatre types de molécules HLA II par individu (2 HLA-DR, 1 HLA-DQ et 1 HLA-DP). La molécule HLA-DR dont la chaîne bêta (β) est codée 25 par le gène DRB1 est la plus exprimée. A ce jour, la chaîne bêta codée par le gène DRB1 est la plus polymorphe et compte 273 allèles. Pour les molécules HLA-DQ et HLA-DP, les deux chaînes (α et β) qui les constituent sont polymorphes mais elles présentent moins d'allèles. On compte en effet 21 allèles DQA1 (chaîne α de HLA-DQ), 45 allèles DQB1 (chaîne β de HLA-DQ), 19 allèles DPA1 (chaîne α de HLA-DP) et 93 allèles DPB1 (chaîne β de HLA-DP). Cependant, la combinaison entre les 30 deux chaînes α et β codées par ces allèles donne naissance à de nombreuses molécules

HLA-DQ et HLA-DP. Du fait de ce polymorphisme, ces isoformes possèdent des propriétés de liaison différentes entre elles, ce qui implique qu'elles peuvent lier des peptides différents d'un même antigène. Ainsi, chaque individu reconnaît dans un antigène un ensemble de peptides dont la nature dépend des molécules HLA II qui le caractérise. Comme il existe un grand nombre d'allèles HLA II, on peut supposer qu'il existe dans une séquence donnée un répertoire important de peptides épitopes T de séquences très différentes, chacun spécifique d'un allèle différent.

Toutefois, cette diversité de molécules HLA II n'est pas aussi importante à l'échelle de chaque population qu'à l'échelle mondiale comme illustré par le Tableau I ci-dessous.

Tableau I : Fréquences géniques des molécules HLA de classe II les plus abondantes dans la population Caucasiennes (Europe, USA) *, d'après Colombani J., 1993, *HLA: fonctions immunitaires et applications médicales*, Eds John Libbey Eurotext.

Molécules	Chaîne α	Fréquence (%)	Chaîne β	Fréquence (%)	Molécules abondantes
HLA-DR	DRA*0101	100	DRB1*0101	9,3	DRA*0101/DRB1*0101
			DRB1*1501	8,0	DRA*0101/DRB1*1501
			DRB1*0301	10,9	DRA*0101/DRB1*0301
			DRB1*0401	5,6	DRA*0101/DRB1*0401
			DRB1*1101	9,2	DRA*0101/DRB1*1101
			DRB1*1301	6,0	DRA*0101/DRB1*1301
			DRB1*0701	14,0	DRA*0101/DRB1*0701
			DRB3*0101	9,2	DRA*0101/DRB3*0101
			DRB3*0202	12,0	DRA*0101/DRB1*0202
			DRB4*0101	28,4	DRA*0101/DRB4*0101
			DRB5*0101	7,9	DRA*0101/DRB5*0101
HLA-DQ	DQA1*0101	17,0	DQB1*0501	14,9	DQA1*0101/ DQB1*0501
			DQB1*0602	9,8	DQA1*0501/ DQB1*0301
			DQB1*0603	5,8	DQA1*0501/ DQB1*0201
			DQB1*0201	21,3	DQA1*0301/ DQB1*0302
			DQB1*0301	12,0	DQA1*0102/ DQB1*0602
			DQB1*0302	13,0	DQA1*0201/ DQB1*0201
HLA-DP	DPA1*0103	78,2	DPB1*0101	7,1	DPA1*0201/ DPB1*0101
			DPB1*0201	11,9	DPA1*0103/ DPB1*0201
			DPB1*0301	9,1	DPA1*0103/ DPB1*0301
			DPB1*0401	40,1	DPA1*0103/ DPB1*0401
			DPB1*0402	11,0	DPA1*0103/ DPB1*0402

*Les fréquences géniques des 2 molécules HLA-DP4 sont indiquées en gras.

Ainsi, pour les molécules HLA-DR et HLA-DQ, une dizaine d'allèles suffisent pour couvrir plus de 60 % de la fréquence génique retrouvée dans la population caucasienne et donc concerner plus de 85 % de la population caucasienne.

Pour les molécules HLA-DP, la molécule la plus fréquente est la molécule DP4 issue des allèles DPA1*0103 et DPB1*0401 qui ont des fréquences géniques de 78,2 % et 40 % respectivement. Trois autres molécules DP ont des fréquences qui dépassent les 5 % : une molécule DP3 (DPA1*0103/DPB1*0301), une 5 molécule DP2 (DPA1*0103/DPB1*0201) et une molécule DP4 (DPA1*0103/DPB1*0402) ; les molécules HLA II sont dénommées en fonction de l'allèle DPB1 codant la chaîne β qui est la plus polymorphe.

Ainsi, quatre molécules HLA-DP (1 molécule DP3, 1 molécule DP2 et 2 molécules DP4) suffisent donc pour couvrir 71 % de la fréquence génique de la 10 population caucasienne, les deux molécules DP4, couvrant à elles seules 51 %. Chacune de ces molécules DP4 comprend une chaîne α variable codée, soit par DPA1*0103 qui est la plus fréquente (78,2 %), soit par DPA1*0201 (20,2 %), les deux chaînes α différant uniquement au niveau de 3 acides aminés (positions 31, 50 et 83 ; Tableau II). Les molécules HLA-DP4 qui présentent une fréquence allélique 15 élevée dans la population caucasienne (de l'ordre de 50 % en Europe et 80 % en Amérique du Nord), sont également présentes à des fréquences non négligeables dans les autres populations (fréquence allélique de l'ordre de 60 % en Amérique du Sud, 60 % en Inde, 25 % en Afrique et 15 % au Japon, Colombani et al., précité).

20 **Tableau II** : Polymorphisme des chaînes α et β des molécules HLA-DP dans la population Caucasiennne (Europe, USA), d'après Colombani J., précité.

Chaîne β	Allèles	Freq (%)	Positions polymorphiques*												
			8	9	11	37	38	57	58	59	67	71	78	86	87
	401	40.1	L	F	G	F	A	A	A	E	I	K	M	G	P
	402	11.0	-	-	-	-	V	D	E	-	-	-	-	-	-
	201	11.9	-	-	-	-	V	D	E	-	-	E	-	-	-
	501	1.3	-	-	-	L	V	E	-	-	-	-	D	-	-
	101	7.1	V	Y	G	Y	-	-	-	-	-	-	D	E	A
	301	9.1	V	Y	L	-	V	D	E	D	L	-	V	D	A
	901	1.1	V	H	L	-	V	D	E	D	I	E	V	D	A
Chaîne α	Allèles	Freq (%)	31	50	83										
	103	78.2	M	Q	T										
	201	21.2	Q	R	A										

* Les séquences, disponibles sur le site internet <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>, sont numérotées selon la numérotation de STERN et al. (*Nature*, 1994, **368**, 215-221) pour la molécule HLA-DR ; comme les résidus en positions 23 et 24 sont absents dans les séquences de DPB, les résidus indiqués aux positions 37, 38, 57, 59, 67, 71, 78, 86, 87, 88 et 89 correspondent respectivement aux positions 35, 36, 55, 56, 57, 65, 69, 76, 84, 85, 86 et 87 dans la séquence de DPB.

Pourtant, malgré leur fréquence élevée chacune de ces molécules DP4 n'a été que très partiellement étudiée ; les études les plus nombreuses résultent en fait de l'isolement de clones de lymphocytes T CD4+ restreints aux molécules HLA-DP4 et spécifiques des peptides présentés dans le Tableau III, ci-après, issus des antigènes suivants :

- antigènes de microorganismes pathogènes tels que la toxine téstanique (WYSS CORAY et al., *Eur J. Immunol.*, 1992, **22**, 2295), l'antigène WI-1 de *Blastomyces dermatitidis* (CHANG et al., *Inf. Immun.*, 2000, **68**, 502), la protéine hsp 15 de *Mycobacterium bovis* (GASTON et al., *Int. Immunol.*, 1991, **3**, 965-972), l'antigène S du virus de l'hépatite B (HBsAg pour *Hepatitis B virus S antigen* ; CELIS et al., *J. Virol.*, 1989, **63**, 747), la phosphoprotéine du virus de la rage (RV-NS pour *Rabies Virus Non-Structural phosphoprotein*) ou la neuraminidase du virus de la grippe (IBV-Nm pour *influenza B virus Neuraminidase* ; CELIS et al., *J. Immunol.*, 1990, **145**, 305) et la protéine UL21 du virus de l'*herpes simplex* de type 1 (KOELLE et al., *J. Virol.*, 2000, **74**, 10930-10938),

- allergènes tels que l'allergène majeur de *Dermatophagoïdes pteronyssinus* (HIGGINS, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1992, **90**, 749), et
- antigènes tumoraux tels que MAGE-A3 (SCHULTZ et al., *Cancer Res.*, 2000, **60**, 6272), et NY-ESO1 (ZENG et al., *P. N. A. S.*, 2001, **98**, 3964-3969).

Tableau III: Séquences des peptides ligands des molécules HLA-DP4

Peptides	Séquences	Numéro d'identification	Référence
TT 947-967	FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	SEQ ID NO:1	Wyss Coray et al., 1992
PSN 265	DPYNCWDWPYHEKYDWDLWNKWCN	SEQ ID NO:2	Chang et al., 2000
S1d (HBsAg 19-28)	FFLLTRILTI	SEQ ID NO:3	Celis et al., 1989
NS-p2 (RV NS 101-120)	GVQIVRQIRSGERFLKIWSQ	SEQ ID NO:4	Celis et al., 1990
FLU-p1 (VIB Nm 247-260)	GISKCRFLKIREGR	SEQ ID NO:5	Celis et al., 1990.
MT 451-466	IAFNSGMEPGVVAEKV	SEQ ID NO:6	Gaston et al., 1991
MT 456-471	GMEPGVVAEKVRNLSV	SEQ ID NO:7	Gaston et al., 1991
Derp 101-119	PNAQRFGISNYCQIYP	SEQ ID NO:8	Higgins, 1992
MAG 247-258	TQHFVQENYLEY	SEQ ID NO:9	Schultz et al., 2000
NY-ESO1 161-180	MWITQCFLPVFLAQPPSGQR	SEQ ID NO:10	Zeng et al., 2001
NY-ESO1 156-175	QLSLLMWITQCFLPVFLAQPP	SEQ ID NO:11	Zeng et al., 2001
UL21 283-293	RELWWVVFYAGD	SEQ ID NO:12	Koelle et al., 2000
IL3 127-146	GPGAPADVQYDLYLNVANRR	SEQ ID NO:13	Falk et al., 1994
UNK1 (UNK 1-17)	EKKYFAATQFEPLAARL	SEQ ID NO:14	Falk et al., 1994
UNK2 (UNK 2-17)	KKYFAATQFEPLAARL	SEQ ID NO:15	Falk et al., 1994
UNK3 (UNK 1-13)	EKKYFAATQFEPL	SEQ ID NO:16	Falk et al., 1994

Les études précitées qui reposent sur l'isolement de clones de lymphocytes T CD4+ restreints aux molécules HLA-DP4 mettent en œuvre un test fonctionnel (test de prolifération) qui n'a pas permis de mettre en évidence un motif de liaison aux molécules DP4, partagé par l'ensemble de ces peptides. En outre, ce test est très lourd à mettre en œuvre du fait qu'il nécessite de nombreux patients correctement échantillonnés, de manière à ce qu'ils représentent la diversité des molécules HLA II de l'ensemble de la population. En outre, les épitopes définis sont ceux utilisés par le système immunitaire des patients lors de l'infection naturelle par un antigène ; ces épitopes ne sont pas nécessairement les plus efficaces pour induire une réponse immunitaire contre ce même antigène.

En utilisant une autre approche, à savoir l'analyse de quatre peptides naturellement présents sur les molécules DP4 [peptide 127-146 de la chaîne α du

récepteur de l'IL3 (IL3 127-146 ; SEQ ID NO:13) et trois peptides d'origine inconnue : UNK1 (SEQ ID NO:14), UNK2 (SEQ ID NO:15) et UNK3 (SEQ ID NO:16) ; Tableau III], FALK et al. (*Immunogenetics*, 1994, 39, 230-242) ont proposé une séquence consensus de liaison aux molécules DP4. Cette séquence comprend trois résidus d'ancrage respectivement en positions P1, P7 et P9/P10. P1 et P7 sont hydrophobes ou aromatiques (Y, V, L, F, I, A, M, W) et P9/P10 sont de préférence aliphatisques ; toutefois, un résidu Y est toléré en position P9/P10 mais pas un résidu F. Les résidus P1 et P7 sont précédés de groupes de résidus chargés (K, R, E, N, Q pour P1 et N, K, E pour P7), et des résidus de petite taille (A, V) sont fréquents en position P3 et P9. Le Tableau III montre que les seuls autres peptides ligands de DP4 présentant ce motif sont les peptides chevauchants NY-ESO1 161-180 et NY- ESO1 156-175. En conséquence, ce motif proposé par FALK et al. ne permet pas de définir un motif de liaison aux molécules DP4 partagé par l'ensemble des peptides ligands des molécules DP4, identifiés par des tests fonctionnels.

Alors que des tests de liaison aux molécules DP9 (DONG et al., *J. Immunol.*, 1995, 154, 4536-4545) et DP2 (CHICZ et al., *J. Immunol.*, 1997, 159, 4935-4942), dérivés de ceux développés pour les molécules DR [MARSHALL et al., *J. Immunol.*, 1994, 152, 4946 (HLA-DR1) ; Brevet FR 99 0879 et TEXIER et al., *J. Immunol.*, 2000, 164, 3177 (HLA-DR1, -DR2, -DR3, -DR4, -DR7, -DR11 et -DR13)] permettent d'isoler des peptides spécifiques de respectivement DP9 et DP2, ces tests ne permettent pas d'isoler des peptides spécifiques de DP4 (CHICZ et al., précédent) : les peptides isolés par le test de liaison à DP2 ont une forte affinité pour DP2 (activité de liaison < 10 nM) alors que des peptides connus pour être restreints à DP4 comme le peptide HBsAg 14-33, présentent une activité médiocre (20 µM).

En outre, du fait des différences importantes des résidus du site de liaison, entre les principales molécules DP, les tests de liaison développés pour ces molécules ne permettent pas d'identifier des peptides restreints à DP4.

Ainsi, les motifs de liaison partagés par l'ensemble des peptides capables de se lier aux molécules HLA-DP4 n'ont pas été identifiés, notamment du fait qu'il n'existe pas de procédé d'identification de tels peptides qui soit simple à mettre en œuvre et adapté au criblage simultané d'un grand nombre de peptides

comme des banques de peptides chevauchants représentant la séquence d'antigène d'intérêt.

Pourtant, compte tenu de la fréquence des molécules DP4, les peptides qui se lient aux molécules DP4 constituent des peptides candidats pour 5 l'immunothérapie spécifique et la vaccination et pourraient servir au diagnostic de l'état immunitaire de patients ou d'individus normaux.

Les Inventeurs ont donc développé un procédé de sélection de ligands d'HLA-DP4 qui leur a permis d'isoler des ligands spécifiques d'HLA-DP4, notamment des peptides et de préciser le motif de liaison partagé par les peptides 10 ligands d'HLA-DP4, à partir des peptides obtenus.

En conséquence, la présente invention a pour objet un procédé de sélection de molécules ligand d'HLA-DP4 comprenant les étapes suivantes :

(i) incubation d'HLA-DP4 purifiée avec un traceur constitué par un peptide préalablement marqué et apte à être détecté par un signal approprié, lequel 15 peptide traceur est choisi dans le groupe constitué par les peptides présentant un rapport signal/bruit de fond supérieur à 5, à la concentration de 10 nM, dans un test direct de liaison à HLA-DP4, et répondant à la formule générale (I) $Z_1X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9Z_2$ dans laquelle :

- Z_1 et Z_2 , identiques ou différents, sont nuls ou représentent chacun 20 un peptide de 1 à 100 acides aminés naturels ou synthétiques, de préférence de 1 à 30 acides aminés ; de manière encore plus préférée, de 1 à 10 acides aminés,

- X_6 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe, ou bien une cystéine (C),

- X_1 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe et/ou X_9 25 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe, ou bien une cystéine (C), un acide aspartique (D), une glutamine (Q), une sérine (S), une thréonine (T) ou un acide glutamique (E), et

- X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_7 et X_8 représentent chacun un acide aminé naturel ou synthétique,

30 en présence de différentes concentrations de molécule(s) à tester,

(ii) séparation des différents complexes formés,

(iii) révélation des complexes HLA-DP4/peptide traceur par mesure du signal associé audit peptide traceur et

(iv) sélection des molécules ligand qui présentent une activité de liaison $IC_{50} < 1000$ nM, correspondant à la concentration de ces molécules qui 5 inhibent 50 % de la liaison du peptide traceur.

Les résidus X_1 , X_6 et X_9 de la formule générale (I) telle que définie ci-dessus, qui constituent les résidus d'ancrage dans les poches de la molécule d'HLA-DP4, sont également dénommés respectivement résidus P1, P6 et P9. Parmi ces résidus, les résidus X_1 (ou P1) et X_6 (ou P6) sont les résidus qui contribuent majoritairement à la liaison à HLA-DP4. Le résidu X_9 ou P9 est moins important et contribue 10 plus faiblement à la liaison à HLA-DP4.

Au sens de la présente invention, on entend par :

- acides aminés naturels ou synthétiques, les 20 α -acides aminés naturels communément trouvés dans les protéines (code à une lettre: A, R, N, D, C, Q, 15 E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y et V), certains acides aminés rarement rencontrés dans les protéines (hydroxyproline, hydroxylysine, méthyllysine, diméthyllysine..), les acides aminés qui n'existent pas dans les protéines tels que la β -alanine, l'acide γ -aminobutyrique, l'homocystéine, l'ornithine, la citrulline, la canavanine, la norleucine, la cyclohexylalanine..., ainsi que les énantiomères et les diastéréoisomères des acides 20 aminés précédents.

- acide aminé hydrophobe, un acide aminé sélectionné parmi (code à une lettre) : A, V, L, I, P, W, F et M.

- acide aminé aromatique, un acide aminé sélectionné parmi (code à une lettre) : F, W et Y.

25 L'utilisation d'un peptide traceur, tel que défini à l'étape (i) permet de sélectionner effectivement des ligands spécifiques d'HLA-DP4, c'est-à-dire des molécules, notamment des peptides, qui présentent une bonne affinité pour HLA-DP4 c'est-à-dire une activité de liaison < 1000 nM.

Un peptide traceur conforme à l'invention est sélectionné en mettant 30 en œuvre un test direct de liaison à HLA-DP4, par exemple en suivant les étapes (i) (ii) et (iii) du protocole défini ci-dessus mais en l'absence de compétiteur, correspondant à la molécule à tester. Le signal approprié détecté (fluorescence...) révèle les

complexes HLA-DP4/peptide traceur [étape (iii)] et le bruit de fond représente le signal correspondant, obtenu en l'absence d'HLA-DP4.

De préférence :

- X_6 est sélectionné parmi L, I, W, F, M, Y et C, et
- 5 - X_1 est sélectionné parmi A, V, L, I, W, F, M et Y, et/ou X_9 est sélectionné parmi A, V, L, I, P, W, F, M, Y, C, D, Q, S, T et E.

Des peptides traceurs conformes à l'invention sont représentés par les peptides NS-p2 (SEQ ID NO:4), MAG 247-258 (SEQ ID NO:9), UL21 283-293 (SEQ ID NO:12), IL3 127-146 (SEQ ID NO:13), UNK1 (SEQ ID NO: 14), UL21 10 283-302 (SEQ ID NO:18) et MAG 245-258 (SEQ ID NO:19).

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, le peptide traceur est choisi dans le groupe constitué par les peptides biotinylés, radio-marqués et les peptides couplés à un fluorochrome.

A l'étape (ii), la séparation des complexes formés des peptides non liés est effectuée par exemple, par transfert des complexes formés sur une plaque de microtitration préalablement recouverte d'un anticorps spécifique d'HLA-DP, par chromatographie sur une colonne de gel-filtration ou par centrifugation.

Lorsque le peptide traceur est radiomarqué ou couplé à un fluorochrome, notamment à l'europium, les complexes HLA-DP4/peptide traceur sont 20 détectés de manière directe par la mesure de la radioactivité ou de la fluorescence émise par lesdits complexes.

Lorsque le peptide traceur est biotinylé, les complexes HLA-DP4/peptide traceur sont détectés de manière indirecte à l'aide de streptavidine conjuguée, par exemple par une révélation immunoenzymatique à l'aide de streptavidine 25 conjuguée à une enzyme telle que la phosphatase alcaline et d'un substrat de la phosphatase alcaline tel que le 4-méthyl-umbelliféryl-phosphate (MUP).

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, le peptide traceur est utilisé à une concentration < 200 nM, de préférence inférieure à 20 nM ; de manière encore plus préférée, le traceur est utilisé à la concentration de 30 10 nM.

Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ladite HLA-DP4 de l'étape i) est choisie dans le groupe constitué par les molécules codées par les allèles DPA1*103/DPB1*0401 et DPA1*103/DPB1*0402.

Le procédé selon l'invention permet avantageusement de sélectionner 5 n'importe quel ligand d'HLA-DP4; il s'agit aussi bien de molécules minérales ou organiques comme les peptides et les pseudopeptides.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, lesdites molécules à tester représentent une banque de peptides chevauchants recouvrant la séquence d'un antigène.

10 La présente invention a également pour objet des ligands d'HLA-DP4 susceptibles d'être obtenus par le procédé de sélection tel que défini ci-dessus, correspondant à une molécule minérale ou organique, naturelle ou synthétique, présentant une activité de liaison à HLA-DP4 inférieure à 1000 nM.

15 L'activité de liaison à HLA-DP4 d'une molécule ligand, telle que définie ci-dessus, correspond à la concentration de ladite molécule ligand qui inhibe 50 % de la liaison à HLA-DP4 d'un peptide traceur marqué, dans un test en compétition comme le procédé de sélection de ligands d'HLA-DP4 défini ci-dessus.

20 Parmi ces molécules ligand, on peut citer notamment les peptides et les peptides modifiés tels que les glycopeptides, les lipopeptides, les peptides comprenant des acides aminés D, des liaisons pseudo-peptidiques (pseudo-peptides) ou des modifications des extrémités C-ou N-terminales.

25 La partie lipidique du lipopeptide ligand est notamment obtenue par addition d'un motif lipidique sur une fonction α -aminée desdits peptides ou sur une fonction réactive de la chaîne latérale d'un acide aminé de la partie peptidique ; elle peut comprendre une ou plusieurs chaînes, dérivées d'acides gras en C₄-C₂₀, éventuellement ramifiées ou insaturées (acide palmitique, acide oléique, acide linoléique, acide linolénique, acide 2-amino hexadécanoïque, pimélastide, trimétauxide) ou dérivées d'un stéroïde. Le procédé de préparation de tels lipopeptides est notamment décrit dans les Demandes internationales WO 99/40113 ou WO 99/51630. La partie lipidique préférée est notamment représentée par un groupe N^α-acétyl-lysine N^ε(palmitoyl), également dénommée Ac-K(Pam).

Selon un mode de réalisation avantageux dudit peptide ligand d'HLA-DP4 tel que défini ci-dessus, sa séquence peptidique répond à la formule générale (I) $Z_1X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9Z_2$, dans laquelle :

- Z_1 et Z_2 , identiques ou différents, sont nuls ou représentent chacun un peptide de 1 à 100 acides aminés tels que définis ci-dessus, de préférence de 1 à 30 acides aminés ; de manière encore plus préférée, de 1 à 10 acides aminés,
- X_6 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe ou bien une cystéine (C),
- X_1 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe et/ou X_9 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe, ou bien une cystéine (C), un acide aspartique (D), une glutamine (Q), une sérine (S), une thréonine (T) ou un acide glutamique (E), et
- X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_7 et X_8 représentent chacun un acide aminé naturel ou synthétique,

15 à condition que ledit peptide ligand d'HLA-DP4 de formule générale (I) ne corresponde à aucune des séquences SEQ ID NO: 1 à 17.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit peptide ligand :

- X_6 est sélectionné parmi L, I, W, F, M, Y et C, et
- X_1 est sélectionné parmi A, V, L, I, W, F, M et Y, et/ou X_9 est

20 sélectionné parmi A, V, L, I, P, W, F, M, Y, C, D, Q, S, T et E.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit peptide ligand se lie spécifiquement à DPB1*0401 (activité de liaison à DPB1*0401 au moins deux fois supérieure à l'activité de liaison à DPB1*0402) et X_6 est différent de C, et/ou X_1 est différent de A et de V, et/ou X_9 représente W ou Y ou X_9 est différent de E et de C, et/ou X_4 est différent de K et de R.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit peptide ligand se lie spécifiquement à DPB1*0402 (activité de liaison à DPB1*0402 au moins deux fois supérieure à l'activité de liaison à DPB1*0401) et X_6 représente C, et/ou X_1 représente A ou V, et/ou X_9 représente E ou C ou X_9 est différent de Y et W, et/ou X_4 représente K ou R.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit peptide ligand, Z_1 et Z_2 sont choisis dans le groupe constitué par :

- les séquences de l'antigène qui sont adjacentes à l'épitope CD4+ restreint à HLA-DP4 tel que défini ci-dessus, et/ou

- un ou plusieurs épitopes T CD8+, et/ou
- des épitopes CD4+ multiples, tels que le peptide 830-846 de la 5 toxine tétanique TT (O'SULLIVAN et al., *J. Immunol.*, 1991, 147, 2663-2669), le peptide 307-319 de l'hémagglutinine HA du virus de la grippe (O'SULLIVAN et al, précité), l'épitope Pan DR ou PADRE (ALEXANDER et al., DEL GUERCIO et al., FRANKE et al, précités) et des peptides issus des antigènes de *Plasmodium falciparum* tels que le peptide CS.T3 (SINIGAGLIA et al., *Nature*, 1988, 336, 778-780) et 10 les peptides CSP, SSP2, LSA-1 et EXP-1 (DOOLAN et al., *J. Immunol.*, 2000, 165, 1123-1137) et/ou
- un ou plusieurs épitopes B, par exemple un peptide ou un glycopeptide dans lequel ledit épitope B est constitué par un sucre (ALEXANDER et al., précité).

15 De telles séquences permettent avantageusement de déclencher ou de moduler une réponse immunitaire, de manière appropriée.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux dudit peptide ligand, il présente la séquence SEQ ID NO:84 correspondant au peptide NY-ESO1 87-111.

20 La présente invention englobe également les peptides ligands tels que définis ci-dessus, polymérisés.

La présente invention a également pour objet un procédé d'identification de peptides ligands d'HLA-DP4 tels que définis ci-dessus, à partir d'une séquence d'acides aminés, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes 25 suivantes :

- a) l'établissement d'une matrice de liaison à HLA-DP4 par calcul, -pour tous les mutants d'un peptide traceur tel que défini ci-dessus, représentant l'ensemble des substitutions des résidus en position 1, 4, 6 ou 9 dudit peptide traceur par les 19 autres acides aminés naturels-, du rapport des IC₅₀ desdits peptides mutants 30 et dudit peptide traceur, à l'aide du test de liaison à HLA-DP4 tel que défini ci dans le procédé ci-dessus,

b) l'évaluation de la liaison à HLA-DP4 de peptides d'au moins 9 acides aminés inclus dans ladite séquence d'acides aminés, par calcul, pour chaque fragment de 9 acides aminés dudit peptide, de la somme des scores de liaison à HLA-DP4 des résidus en position 1, 4, 6 et 9 dudit fragment, à partir de la matrice de liaison établie en a), et

c) l'identification des peptides ligands d'HLA-DP4 correspondant à ceux dont la perte de liaison à HLA-DP4, par rapport audit peptide traceur est la plus faible, c'est à dire ceux dont la somme des scores de liaison présente la valeur la plus faible exprimée en logarithme (log) ; de préférence inférieure à 2, de manière préférée inférieure à 1, de manière encore plus préférée, proche de 0.

Cette matrice de liaison à HLA-DP4 qui est illustrée pour le peptide de référence UNK 3-15 (SEQ ID NO: 28), par le Tableau XIV de l'exemple 6, permet d'estimer l'activité de liaison à HLA-DP4 de n'importe quel peptide d'au moins 9 acides aminés ; des peptides présentant des scores de liaison de respectivement 0, 1, 2, 3 et 4 correspondent à des peptides présentant une perte de liaison d'un facteur 1, 10, 100, 1000 et 10000 par rapport au peptide UNK 3-15 (IC_{50} 10 nM), c'est-à-dire présentant une activité de liaison estimée de respectivement 10 nM, 100 nM, 1000 nM, 10 μ M et 100 μ M.

Par exemple, l'antigène tumoral NY-ESO1 comprend un peptide WITQCFLPV possédant un score de liaison à DP*0401 et DP*0402, de $0 + 0,3 + 0 + 0,3 = 0,6$ correspondant à une activité de liaison estimée (à l'aide de la matrice de liaison à HLA-DP4) de 39 nM et une activité calculée (par le test de liaison à DP*0401 et DP*0402) de respectivement 20 nM et 67 nM.

Le procédé d'identification de peptides ligands d'HLA-DP4 selon l'invention qui est facile à mettre en œuvre et automatisable permet, notamment à l'aide d'un logiciel approprié, de prédire la séquence des peptides ligands d'HLA-DP4 présents dans toutes les protéines représentant des antigènes d'intérêt. Les séquences peptidiques ainsi identifiées peuvent ensuite être vérifiées par un test de liaison à HLA-DP4, défini dans le procédé de sélection de ligands d'HLA-DP4 selon l'invention.

La présente invention a également pour objet une molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle code pour un peptide ligand tel que défini ci-dessus.

5 L'objet de l'invention englobe également les molécules d'acide nucléique recombinantes comprenant au moins une molécule d'acide nucléique conforme à l'invention liée à au moins une séquence hétérologue.

Au sens de la présente invention, on entend par séquence hétérologue relativement à une séquence d'acide nucléique codant un peptide ligand, toute 10 séquence d'acide nucléique autre que celles qui, dans la nature, sont immédiatement adjacentes à ladite séquence d'acide nucléique codant un peptide.

L'objet de la présente invention englobe en particulier :

- des cassettes d'expression comprenant au moins une molécule 15 d'acide nucléique conforme à l'invention et les séquences nécessaires au contrôle de la transcription et de la traduction de ladite molécule d'acide nucléique (promoteur, intron, codon d'initiation (ATG), codon stop, signal de polyadénylation), et

- des vecteurs recombinants, comprenant un insert constitué par une molécule d'acide nucléique conforme à l'invention. Avantageusement ces vecteurs 20 d'expression, comprennent au moins une cassette d'expression telle que définie ci-dessus.

20 De nombreux vecteurs dans lesquels on peut insérer une molécule d'acide nucléique d'intérêt afin de l'introduire et de la maintenir dans une cellule hôte eucaryote ou procaryote, sont connus en eux-mêmes ; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple réplication de la 25 séquence d'intérêt, expression de cette séquence, maintien de cette séquence sous forme extrachromosomique, ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte), ainsi que de la nature de la cellule hôte.

Par exemple, on peut utiliser entre autres des vecteurs viraux tels que les adénovirus, les rétrovirus, les lentivirus et les AAV, dans lesquels a été insérée préalablement la séquence d'intérêt ; on peut également associer ladite séquence (isolée ou insérée dans un vecteur plasmidique) avec une substance lui permettant de franchir la membrane des cellules-hôte, par exemple une préparation de liposomes, de

lipides ou de polymères cationiques, ou bien l'injecter directement dans la cellule hôte, sous forme d'ADN nu.

L'invention a en outre pour objet des cellules procaryotes ou eucaryotes transformées par au moins une molécule d'acide nucléique conforme à 5 l'invention.

Des cellules transformées conformes à l'invention peuvent être obtenues par tous moyens, connus en eux-mêmes, permettant d'introduire une molécule d'acide nucléique dans une cellule-hôte. Par exemple, dans le cas de cellules animales, on peut utiliser les vecteurs ou les préparation de lipides tels que définis ci- 10 dessus.

La présente invention a également pour objet une composition immunomodulatrice, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un ligand d'HLA-DP4 ou une molécule d'acide nucléique codant un peptide ligand d'HLA-DP4 tels que définis ci-dessus, et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

15 Avantageusement, ladite molécule d'acide nucléique est incluse dans un vecteur tel que défini ci-dessus.

Selon le choix du ligand d'HLA-DP4 et de son mode de présentation (voie d'administration, dose, adjonction ou non d'adjuvant), une telle composition immunomodulatrice entraîne, soit une activation des lymphocytes T, soit leur anergie.

20 En effet, il a été montré qu'une injection unique, par voie sous-cutanée, d'une faible quantité de peptide entraîne une anergie (OLDFIELD et al., *J. Immunol.*, 2001, 167, 1734-1739.). En revanche, il est connu que des injections répétées de quantités supérieures de peptide en présence d'adjuvant entraîne une activation des lymphocytes T. En outre, l'association à des peptides Z_1 et Z_2 tels que définis ci- 25 dessus, permet également d'augmenter la réponse immunitaire spécifique de l'antigène (ALEXANDER et al., précité).

30 En conséquence, ladite composition est utilisée aussi bien pour la vaccination contre un agent pathogène ou une cellule tumorale, que pour le traitement des maladies autoimmunes (sclérose en plaques, diabète insulino-dépendant), de l'allergie ou du rejet de greffe.

La présente invention a également pour objet un réactif de diagnostic de l'état immunitaire d'un individu, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un

ligand d'HLA-DP4 tel que défini ci-dessus, éventuellement marqué ou complexé, notamment complexé à des molécules HLA-DP4 marquées (biotinylées), sous la forme de complexes multimériques comme des tétramères.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un ligand 5 d'HLA-DP4 ou d'une molécule d'acide nucléique codant un peptide ligand d'HLA-DP4 tels que définis ci-dessus pour la préparation d'un médicament immunomodulateur ou d'un réactif de diagnostic de l'état immunitaire d'un individu.

Au sens de la présente invention, on entend par diagnostic de l'état immunitaire d'un individu, la détection de la présence, chez ledit individu, de lymphocytes T CD4+ spécifiques d'un antigène issu d'un agent pathogène ou d'une cellule tumorale, d'un allergène, d'un alloantigène ou d'un autoantigène. 10

Le réactif conforme à l'invention qui est apte à détecter la présence de lymphocytes T CD4+ spécifiques d'un antigène est utilisé pour la détection : d'une infection par un agent pathogène, d'un cancer, d'une maladie autoimmune, d'une allergie ou d'un rejet de greffe, à partir d'un échantillon biologique d'un patient. 15

La présente invention a également pour objet une méthode de diagnostic de l'état immunitaire d'un individu comprenant les étapes de :

- mise en contact d'un échantillon biologique dudit individu avec un réactif de diagnostic tel que défini ci-dessus, et 20
- détection de lymphocytes T CD4+ spécifiques d'un antigène par tout moyen approprié.

La présente invention a également pour objet un kit de détection de l'état immunitaire d'un individu, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un réactif tel que défini ci-dessus, associé à un moyen de détection de lymphocytes T CD4+ spécifiques d'un antigène. 25

La détection des lymphocytes T CD4+ spécifiques d'un antigène, est effectuée par tous moyens, connus en eux-mêmes. Par exemple, on peut utiliser des moyens directs comme les tests de prolifération lymphocytaire ou la cytométrie de flux en présence de complexes multimériques tels que définis ci-dessus, ou bien des 30 moyens indirects comme le dosages de cytokines telles que l'IL2, l'IL4, l'IL5 et l'INF γ , notamment par des techniques immunoenzymatiques (ELISA, RIA, ELISPOT).

De manière plus précise :

* pour ce qui concerne le test de prolifération :

Une suspension de cellules (PBMC, PBMC déplétées en cellules CD8+, lymphocytes T préalablement enrichis par une étape de culture *in vitro* avec les peptides tels que définis ci-dessus ou des lymphocytes T clonés) est cultivée pendant 5 à 5 jours en présence desdits ligands d'HLA-DP4 et au besoin de cellules présentatrices appropriées, telles que des cellules dendritiques, des PBMC autologues ou hétérologues, des cellules lymphoblastoïdes telles que celles obtenues après infection par le virus EBV ou des cellules génétiquement modifiées. La prolifération des cellules est mesurée par incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules. Les 10 peptides tels que définis ci-dessus, permettent de révéler dans la suspension initiale la présence de cellules spécifiques de ces peptides.

* pour ce qui concerne le test ELISPOT :

Le test ELISPOT permet de révéler la présence de cellules T sécrétant de l'IFN- γ , spécifiques d'un peptide tel que défini ci-dessus.

15 De manière plus précise, les cellules T sont révélées par mesure de la sécrétion d'IFN- γ après incubation des PMBC des patients avec lesdits peptides conformément à la méthode décrite dans la Demande Internationale WO 99/51630 ou Gahéry-Ségard et al., (*J. Virol.*, 2000, 74, 1964).

20 * pour ce qui concerne la mise en œuvre de complexes multimériques et notamment de complexes tétramériques :

- on met en contact un échantillon biologique, de préférence des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) avec des complexes tétramériques tels que définis ci-dessus, et

- on analyse des cellules marquées par cytométrie de flux.

25 De manière avantageuse, préalablement à la mise en contact de l'échantillon biologique avec ledit complexe, on l'enrichit en cellules T CD4+, en le mettant en contact avec des anticorps anti-CD4, pour enrichir ledit échantillon.

Les tétramères sont préparés, comme précisé, par exemple dans NOVAK et al. (*J. Clin. Investig.*, 1999, 104, R63-R67) ou dans KURODA et al. (*J. Virol.*, 2000, 74, 18, 8751-8756).

Brièvement, les tétramères sont fabriqués en incubant, pendant 72 heures à 37°C et dans un tampon phosphate citrate 10 mM, NaCl 0,15 M à un pH

compris entre 4,5 et 7, des molécules HLA II solubles et biotinylées avec un excès d'un facteur 10 de ligands d'HLA-DP4 tels que définis ci-dessus.

La forme tétramérisée est obtenue en ajoutant à la préparation de la streptavidine marquée par un fluorochrome en quantité quatre fois moindre (mole à mole) par rapport aux molécules HLA II. L'ensemble est incubé une nuit à température ambiante.

Pour utiliser ces tétramères, on met en contact une suspension de cellules (PBMC, PBMC déplétées en cellules CD8+, lymphocytes T préalablement enrichis par une étape de culture *in vitro* avec les ligands d'HLA-DP4 tels que définis ci-dessus ou des lymphocytes T clonés) avec un ou plusieurs tétramères (10 à 20 mg/ml) pendant 1 à 3 heures. Après lavage, la suspension est analysée par cytométrie de flux : on visualise le marquage des cellules par les tétramères grâce au fait que ces constructions sont fluorescentes.

La cytométrie de flux permet de séparer les cellules marquées par les tétramères des cellules non marquées et d'effectuer ainsi un tri cellulaire.

La présente invention a ainsi, en outre, pour objet un procédé de tri de lymphocytes T CD4+ spécifiques d'un antigène, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- mise en contact d'un échantillon cellulaire avec des tétramères marqués par un fluorochrome, préparés à partir de complexes entre des ligands d'HLA-DP4 tels que défini ci-dessus et des molécules HLA-DP4 solubles, et
- tri des cellules liées audit tétramères, en cytométrie de flux.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de l'objet de la présente invention, avec références aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 illustre l'activité de liaison de peptides aux molécules HLA-DP4 codées respectivement par DPB1*0401 (A) et DPB1*0402 (B), déterminée selon le procédé conforme à l'invention avec comme peptide traceur, le peptide UNK1 biotinylé (10 nM) ; le pourcentage de liaison aux molécules DP4 est exprimé en fonction de la concentration molaire des peptides. La liaison maximale (100 %) correspond à la valeur obtenue pour le peptide traceur seul, en l'absence de peptide

compétiteur. UNK: UNK1 (SEQ ID NO: 14), IL: IL3 127-146 (SEQ ID NO: 13), MAG: MAG 245-258 (SEQ ID NO: 19), NSP2: SEQ ID NO: 4, TT: TT 947-963 (SEQ ID NO: 20), DQB: DQB 43-57 (SEQ ID NO: 23), HCl 46-63: SEQ ID NO: 24) et HA: HA 306-318 (SEQ ID NO: 21),

5 - la figure 2 illustre la corrélation entre le score de liaison à HLA-DP4 (estimé par le procédé d'identification de peptides ligands d'HLA-DP4 conforme à l'invention) et l'affinité pour les molécules HLA-DP4 (déterminée par la valeur d' IC_{50} , mesurée à l'aide du test de liaison à HLA-DP4 défini dans le procédé de sélection de peptides ligands d'HLA-DP4 conforme à l'invention), analysée sur un
10 ensemble de 44 peptides.

EXEMPLE 1 : PRINCIPE DU TEST DE LIAISON HLA-DP4/PEPTIDE

1) Préparation des peptides

— Tous les peptides ont été synthétisés selon la stratégie Fmoc en synthèse parallèle sur phase solide, purifiés par HPLC et contrôlés par spectrométrie de
15 masse (ES-MS).

Les peptides sont biotinylés au niveau de leur résidu NH_2 terminal, selon le protocole tel que décrit dans Texier et al., précité.

2) Préparation des anticorps

Les anticorps spécifiques des molécules HLA-DP tel que l'anticorps
20 B7/21 (WATSON et al., *Nature*, 1983, 304, 358-361), sont purifiés à partir du surnageant de culture des hybridomes correspondants, sur des colonnes de Protéine A-Sépharose. Ces anticorps sont ensuite couplés sur des colonnes Sépharose 4B ou protéine A-Sépharose pour la purification des molécules HLA-DP4.

D'une manière plus précise, après centrifugation à 1100 g, le surnageant de culture des cellules productrices de l'anticorps B7/21 est filtré à 0,22 μ m et son pH est ajusté à 7-8 avec du tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8. Ce surnageant est ensuite appliqué sur une colonne de Protéine A Sépharose 4 Fast Flow de 10 ml, préalablement lavée avec 100 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8. Puis, la colonne est lavée avec 100 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8 et 100 ml de tampon Tris-HCl 30 0,01 M, pH 8. Les anticorps sont élués avec le tampon glycine HCl 0,1 M, pH 3. Le rinçage de la colonne s'effectue avec 100 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8. La fraction éluée qui contient l'anticorps B7/21 est immédiatement neutralisée avec du

tampon Tris-HCl 1 M, pH 8 avant d'être dialysée extensivement contre du tampon borate 0,1 M, pH 8,2. La quantité d'anticorps obtenus est déterminée à partir de la densité optique (D.O.) à 278 nm.

Les colonnes d'affinité destinées à la purification des molécules

5 HLA-DP4 sont préparées de la manière suivante : 0,75 g de Protéine A Sépharose 4B (3 ml de gel final) sont mis à gonfler dans de l'eau puis dans du tampon borate 0,1 M pH 8,2. 15 mg d'anticorps monoclonal, tel que B7/21 en tampon borate 0,1 M pH 8,2 sont ajoutés au gel, préalablement centrifugé. Le couplage est effectué pendant deux heures à température ambiante puis contrôlé par l'absorbance à 278 nm du surnageant.

10 Le gel est ensuite lavé successivement avec 100 ml de tampon borate 0,1 M, pH 8,2, 120 ml de tampon triéthanolamine 0,2 M, pH 8,2 ; 120 ml de tampon diméthylpyrimidate 20 mM, triéthanolamine 0,2 M, pH 8,2 et 150 ml de tampon éthanolamine 0,2 M pH 8,2. Après coulage du gel, celui-ci est rincé avec 150 ml de tampon borate 0,1 M, pH 8,2. Le contrôle final du couplage est effectué par une élution en tampon glycine

15 0,1 M, pH 2,5, NaCl 0,5 M, l'absorbance à 278 nm des fractions de 1 ml devant être inférieure à 0,1. La colonne est immédiatement rincée par 50 ml de tampon borate 0,1 M, pH 8,2 et 20 ml de tampon borate 0,1 M, NaN₃ 0,02%, pH 8,2. Elle est conservée dans ce tampon à 4°C jusqu'à l'emploi.

3) Purification des molécules HLA-DP4

20 Les molécules HLA-DP4 sont purifiées à partir de différentes lignées humaines de lymphocytes B transformées par le virus Epstein Barr (EBV) homozygotes pour DP, par immunoaffinité au moyen d'anticorps monoclonaux spécifiques de toutes les molécules DP. L'origine des lignées et les allèles qui les caractérisent sont indiqués dans le Tableau IV.

Tableau IV

Lignées	Spécificité DP	Allèle DPA1	Allèle DPB1	référence
HOM2	DP4	DPA1*0103	DPB1*0401	*
BOLETH	DP4	DPA1*0103	DPB1*0401	*
PITOUT	DP4	DPA1*0103	DPB1*0401	SOUTHWOOD et al., précité
HHKB	DP4	DPA1*0103	DPB1*0401	DAVENPORTH et al., <i>P. N.A.S.</i> , 1995, 92, 6567.
SHU	DP4	DPA1*0103	DPB1*0402	*
MLF	DP4	DPA1*0103	DPB1*0402	*
BM92	DP4	DPA1*0103	DPB1*0402	*

* l'origine des lignées est décrite sur le site internet de la Collection européenne de Culture Cellulaire (<http://fuseiv.co.uk/camr/>.)

La purification des molécules HLA-DP4 est effectuée à partir d'un 5 culot de ces cellules humaines transformées par EBV, selon un protocole dérivé de ceux utilisés pour les molécules HLA-DR (GORGA et al., *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 16087; TEXIER et al., précité).

D'une manière plus précise, 5 à 6.10⁹ cellules sont lysées à une concentration d'environ 10⁸ cellules/ml en tampon de lyse (Tris 0,01 M, NaCl 0,15 M, 10 NaN₃ 0,02%, pH 7, NP40 1%, aprotinine 10 µg/ml, EDTA 5 mM, PMSF 10 µM) dans la glace pendant 30 minutes. Le milieu de lyse est débarrassé des gros débris cellulaires par centrifugation à 1100 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite ultracentrifugé à 100 000 g à 4°C pendant 1 heure. La suite de la purification se déroule en chambre froide à 4°C. Le lysat est passé successivement sur une colonne 15 de Sépharose 4B (10 ml de gel préparés en PBS 1x), une colonne de Protéine A Sépharose 4B (5 ml de gel préparés en ²PBS 1x) puis sur la colonne d'affinité anti-DP. Les colonnes sont ensuite rincées par 250 ml de tampon de lyse. La colonne Sépharose 4B est jetée. La colonne Protéine A Sépharose 4B est rincée avec 25 ml de tampon TBS 1x (Tris 0,01 M, NaCl 0,15 M, NaN₃ 0,02%, pH 7) ; 50 ml de tampon 20 (glycine, 0,1M; NaCl 0,5M, pH 2,5) et 200 ml de tampon PBS 1x, avant d'être stockée à 4°C. La colonne anti-DP est rincée avec 250 ml de tampon TBS contenant 1 mM de dodécy1 maltoside (DM). Elle est ensuite éluée individuellement avec le tampon d'élution (Na₂CO₃ 100 mM, NaCl 500 mM, NaN₃ 0,02%, DM 1,1 mM, pH 11,5) en 15 fractions de 3 ml. L'éluat est immédiatement neutralisé avec 10% de

tampon (Tris-HCl 2 M, pH 6,8), puis dialysé extensivement à 4°C contre du tampon PBS 1x contenant 1 mM de DM.

4) Test de liaison HLA-DP4-peptide

Le test de liaison des peptides aux molécules HLA-DP4 est un test en compétition avec une révélation immuno-enzymatique, dérivé de celui mis au point pour des molécules HLA-DR (HLA-DR1: MARSHALL et al., précité, HLA-DR1, -DR2, -DR3, -DR4, -DR7, -DR11 et -DR13 : Brevet FR 99 0879 et TEXIER et al., précité). Il est effectué en plaques 96 puits, ce qui permet d'étudier de nombreux échantillons dans la même expérience. Brièvement, les molécules HLA-DP4 purifiées sont incubées avec un peptide biotinylé qui sert de traceur et différentes concentrations du peptide à tester. Le peptide biotinylé est un peptide ligand de DP4, il s'agit d'un peptide reconnu par des lymphocytes T CD4+ spécifiques de DP4 tel que ceux précisés dans le Tableau III ci-dessus ou d'un nouveau peptide isolé à l'aide du présent test de liaison à DP4. Parmi ces peptides, on peut citer par exemple le peptide UNK1 ou le peptide IL3 127-146. L'incubation se fait dans un tampon, dont le pH peut varier. Il est généralement de 5, l'incubation dure généralement 24h. Après l'incubation, les échantillons sont neutralisés, puis 100 µl de chaque échantillon est transféré sur une plaque ELISA préalablement sensibilisée par un anticorps anti-DP, tel que B7/21. Les complexes molécules HLA-DP/peptides biotinylés fixés au fond de la plaque par l'intermédiaire de l'anticorps sont révélés au moyen de streptavidine phosphatase et d'un substrat fluorescent. L'activité de chaque peptide est caractérisée par la concentration qui inhibe 50 % de la liaison du peptide biotinylé (IC_{50}).

EXEMPLE 2 : DETERMINATION DES PARAMETRES DU TEST DE LIAISON

25 1) Peptide traceur

a) Matériel et méthodes

La liaison de peptides aux deux molécules DP4 (DP401 codé par l'allèle DPA1*0103/DPB1*0401 et DP402 codé par l'allèle DPA1*0103/DPB1*0402) a été analysée en ELISA par le test direct de liaison suivant :

30 Les molécules HLA-DP4 purifiées selon le protocole décrit à l'exemple 1 sont diluées 10 fois en tampon phosphate 10 mM (dilution 1/10). Elles sont ensuite incubées avec différentes concentrations d'un peptide biotinylé (10^{-6} M,

10⁻⁷M et 10⁻⁸M) dans du tampon phosphate 10 mM, NaCl 150 mM, DM 1 mM, citrate 10 mM, thimérosal 0,00 3%, pH 5, dans des plaques 96 puits en polypropylène, pendant 24 h à 37°C. Des échantillons sans molécules DP4 sont utilisés comme témoin. A la fin de l'incubation, les échantillons sont neutralisés avec 50 µl de tampon 5 Tris-HCl 450 mM, pH 7,5, thimérosal 0,003 %, BSA 0,3 %, DM 1 mM. Ils sont ensuite transférés sur des plaques ELISA maxisorp 96 puits sur lesquelles les anticorps anti-DP ont été préalablement adsorbés. Très exactement, 10 µg/ml d'anticorps anti-DP ont été incubés une nuit à 4°C (100 µl/puits) puis les plaques ont été saturées avec le tampon Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, BSA 0,3 %, thimérosal 0,003 % pendant 10 une nuit à 4°C. L'incubation des échantillons sur ces plaques est réalisée pendant deux heures à température ambiante, comme la suite du test puis des lavages extensifs sont effectués entre chaque étape en tampon Tris-HCl 0,1 M pH, 7,5, Tween-20 0,05%. Le peptide biotinylé lié aux molécules HLA-DP est détecté par l'ajout de 100 µl/puits du conjugué streptavidine-phosphatase alcaline (45 minutes) dilué au 1/2000 dans le 15 tampon Tris 10mM pH 7, NaCl 0,15 M; Tween 20 0,05 %, BSA 0,2 %, thimérosal 0,003 %, puis par l'ajout de 200 µl/puits du substrat MUP 100 µM en tampon NaHCO₃ 0,05 M pH 9,8, MgCl₂ 1 mM. L'émission de fluorescence par le produit de la réaction enzymatique est mesurée à 450 nm après excitation à 365 nm et le rapport des valeurs obtenues avec ou dans DP4 est déterminé (R_F = valeur de fluorescence en 20 présence de DP4/valeur de fluorescence en l'absence de DP4).

b) Résultats

La liaison à la molécule DP401 de peptides dérivés des peptides ligands de DP4 précédemment décrits (Tableau III), a été testée :

- peptide bUL21 283-302 (RELWWVFYAGDRALEEEPHAE ; SEQ ID NO: 18)
- 25 - peptide bIL3 127-146 (SEQ ID NO: 13)
- peptide bMAG 245-258 (LLTQHFVQENYLEY ; SEQ ID NO: 19)
- peptide bMT 451-466 (SEQ ID NO:6)
- peptide bNS-p2 (SEQ ID NO:4)
- peptide bTT 947-963 (FNNFTVFSFWLRVPKVSA ; SEQ ID NO: 20)
- 30 - peptide bUNK1 (SEQ ID NO: 14)

Deux peptides spécifiques respectivement de DR1 et de DR7 ont été utilisés comme témoin de la spécificité de liaison à DP4 :

- peptide bHA 306-318 (PKYVKQNTLKLAT ; SEQ ID NO: 21) décrit par HILL et al., *J. Immunol.*, 1994, 152, 2890, et
- peptide bYKL (AYAAAKAAALAA ; SEQ ID NO:22) décrit par MARSHALL et al., précité.

5 Les résultats sont illustrés par le Tableau V.

Tableau V : Sélection des traceurs par un test direct de liaison à HLA-DP4

peptide	$R_F = \text{valeur de fluorescence en présence de DP4} / \text{valeur de fluorescence en l'absence de DP4}$		
	$10^{-6}M$	$10^{-7}M$	$10^{-8}M$
bUL21 283-302	8,3	13,3	10,1
bIL3 127-146	10	20	17,3
bMAG 245-258	1,5	6,7	5,4
bMT 451-466	5,5	4	2
bNS-p2	1	4,2	7,8
bTT 947-963	1,7	3,6	2,7
bUNK1	21,6	21,7	20
bHA 306-318	4,9	4,7	2,7
bYKL	4,8	3,2	3

Les résultats montrent que :

- les peptides bUNK1, bIL3 127-146 ont une forte capacité de liaison à DP4,
- les peptides bTT 947-963 et bMT 451-466 ont une faible capacité de liaison et
- les peptides bNS-p2, bUL21 283-302 et bMAG 245-258 ont une capacité de liaison intermédiaire.

15 Les peptides présentant un $R_F > 5$ à la concentration de $10^{-8} M$ sont considérés comme des bons traceurs utilisables dans le test de liaison.

Le peptide UNK1 qui a donné les meilleurs résultats a été utilisé pour optimiser le test de liaison.

2) temps, pH, concentration du peptide traceur

De manière à disposer d'un test sensible et spécifique de DP4, la concentration en molécules HLA-DP4, la concentration du peptide biotinylé, le pH et le temps d'incubation peptides-molécule HLA-DP4 ont été optimisés avec le peptide bUNK1.

a) Matériels et méthodes

Les molécules HLA-DP4 purifiées selon le protocole décrit à l'exemple 1 ont été diluées au 1/10, 1/20, 1/40 et 1/80, en tampon phosphate 10 mM ; NaCl 150 mM, DM 1 mM ; citrate 10 mM, thimérosal 0,003 % à différents pH (pH 4 ; 5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 et 7), avec le peptide bUNK1 à différentes concentrations et plusieurs concentrations de peptides compétiteurs dans des plaques 96 puits en polypropylène. A la fin de l'incubation à 37°C, les échantillons ont été neutralisés avec 50 µl de tampon Tris-HCl 450 mM, pH 7,5, thimérosal 0,003 %, BSA 0,3 %, DM 1 mM. Ils ont ensuite été transférés sur des plaques ELISA maxisorp 96 puits sur lesquelles les anticorps anti-DP ont été préalablement adsorbés. Très exactement, 10 µg/ml d'anticorps anti-DP ont été incubés une nuit à 4°C (100 µl/puits) puis les plaques ont été saturées avec le tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,5, BSA 0,3 %, thimérosal 0,003 % pendant une nuit à 4°C. L'incubation des échantillons sur ces plaques a été réalisée pendant deux heures à température ambiante, comme la suite du test puis des lavages extensifs ont été effectués entre chaque étape en tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, Tween-20 0,05 %. Le peptide biotinylé lié aux molécules HLA-DP a été détecté par l'ajout de 100 µl/puits du conjugué streptavidine-phosphatase alcaline (45 minutes) diluée au 1/2000 dans le tampon Tris 10 mM pH 7, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05 %, BSA 0,2 %, thimérosal 0,003 %, puis par l'ajout de 200 µl/puits du substrat MUP 100 µM en tampon NaHCO₃ 0,05 M, pH 9,8, MgCl₂ 1 mM. L'émission de fluorescence par le produit de la réaction enzymatique a été mesuré à 450 nm après excitation à 365 nm. La liaison maximale a été déterminée en incubant le peptide biotinylé avec la molécule de CMH II en l'absence de peptide compétiteur. La spécificité de liaison a été contrôlée par l'ajout d'un excès de peptide non biotinylé. Le bruit de fond obtenu ne diffère pas significativement de celui obtenu en incubant le peptide biotinylé sans les molécules de CMH II.

Les résultats sont exprimés sous la forme de la concentration de peptide compétiteur qui inhibe 50 % de la liaison maximale du peptide marqué (IC₅₀).

b) Résultats

Les conditions optimales sont présentées dans le Tableau VI :

5

Tableau VI: Conditions du test de liaison aux molécules DP4

Molécules	DPA1*0103/DPB1*0401	DPA1*0103/DPB1*0402
Peptide biotinylé	bUNK 1-17	bUNK 1-17
Concentration	10 nM	10 nM
pH	5	5
Temps d'incubation	24h	24h
Concentration en HLA-DP4		Dilution 1/20 à 1/40*

* les dilutions indiquées sont effectuées à partir de la préparation de molécules HLA-DP4 purifiées obtenues à l'exemple 1.

EXEMPLE 3 : SENSIBILITE ET SPECIFICITE DU TEST DE LIAISON AUX

10 **MOLECULES DP4**

a) Spécificité

Les résultats, illustrés par la figure 1 montrent que l'activité de liaison mesurée dans le test est spécifique d'HLA-DP4 dans la mesure où :

15 - des peptides connus pour être des ligands de molécules DP4 lient effectivement les molécules HLA-DP*0401 et 0402. Il s'agit du peptide IL3 127-146 (naturellement présent sur une molécule DP4), des peptides spécifiques de lymphocytes T CD4+ restreints à DP4 : NS-p2 (ou NSP2), TT 947-963 et dans une moindre mesure le peptide MAG 245-258, et

20 - des peptides connus pour lier d'autres molécules HLA II ne se lient pas aux molécules HLA-DP*0401 et 0402. Il s'agit des peptides : DQB 43-57 (DVEVYRAVTPLGPPD, SEQ ID NO:23), HCl 46-63 (EPRAPWIEQEGPEYWDQE, SEQ ID NO:24) et HA 306-318 (SEQ ID NO:21) qui sont connus pour se lier respectivement à des molécules HLA-DQ3, HLA-DQ2 et HLA-DR (MARSHALL et al., précité, JOHANSEN et al., *Immunogenetics*, 1996, 45, 142).

La spécificité du test résulte de l'utilisation :

- d'un anticorps spécifique des molécules HLA-DP pour la purification et pour l'adsorption sur les plaques ELISA, et

- du peptide biotinylé qui se lie avec une forte affinité, la figure 1 montre que le peptide UNK qui est la contrepartie non biotinylé du peptide traceur bUNK inhibe totalement la liaison du traceur aussi bien sur la molécule HLA-DPB1*0401 que sur la molécule DPB1*0402.

5 b) Sensibilité

La sensibilité du test est reflétée par l'IC₅₀ observée avec le peptide non-biotinylé (UNK1) correspondant au traceur (bUNK1). La figure 1 indique des valeurs de respectivement 8 et 9 nM pour DPB1*0401 et DPB1*0402, traduisant une bonne sensibilité.

10 La figure 1 montre également que les activités de liaison des peptides aux molécules DPB1*401 et DPB1*402, bien que comparables, sont distinctes. Ces résultats confirment que les molécules DPB1*401 et DPB1*402 présentent des différences qui peuvent être détectées par ce test de liaison.

EXEMPLE 4 : CRIBLAGE DE PEPTIDES LIGANDS DE HLA-DP4 A PARTIR D'UNE BANQUE DE PEPTIDES

1) Matériels et méthodes

Les peptides chevauchants couvrant la séquence totale de l'allergène majeur du venin d'abeille (Api m1), décrits dans le Brevet FR 99 00879, ont été synthétisés et soumis aux tests de liaison à la molécule DP401 et à la molécule DP402, 20 dans les conditions définies dans le Tableau VI.

2) Résultats

Les résultats sont présentés dans le Tableau VII, ci-après :

**Tableau VII : Liaison des peptides de Api m1
aux molécules HLA-DPB1*0401 et DPB1*0402**

Peptide	IC ₅₀ (nM)	
	DP0401	DP0402
1-18	> 10000	> 10000
5-22	> 10000	> 10000
9-26	> 10000	> 10000
13-30	> 10000	> 10000
17-34	> 10000	> 10000
21-38	> 10000	> 10000
25-42	> 10000	> 10000
29-46	> 10000	> 10000
33-50	> 10000	> 10000
37-54	> 10000	> 10000
41-58	> 10000	> 10000
45-62	> 10000	> 10000
49-66	> 10000	> 10000
53-70	> 10000	> 10000
57-74	> 10000	> 10000
61-78	> 10000	> 10000
65-82	50000	6500
69-86	> 10000	> 10000
73-90	> 10000	> 10000
77-94	450	175
81-98	2250	1225
85-102	> 10000	> 10000
89-106	> 10000	> 10000
93-110	> 10000	> 10000
97-114	> 10000	> 10000
101-118	> 10000	> 10000
105-122	> 10000	> 10000
109-126	> 10000	> 10000
113-130	> 10000	> 10000
117-134	> 10000	> 10000

Ces résultats montrent que le peptide 77-94 de l'antigène majeur du venin d'abeille 94 (Api m1 77-94 : TISSYFVGKMYFNLIDTK, SEQ ID NO:17) est un peptide ligand des molécules DPB1*0401 et DPB1*0402.

EXEMPLE 5 : DETERMINATION DES MOTIFS DE LIAISON AUX MOLECULES DP4

1) Matériel et méthodes

5 **a) détermination d'un peptide minimum dérivé d'UNK1 capable de se lier aux molécules DP4**

Des peptides dérivés du peptide UNK1 (UNK 1-17, SEQ ID NO:14) comprenant des délétions croissantes à l'une des extrémités NH₂ ou COOH ou bien aux deux extrémités, ont été synthétisés. La séquence de ces peptides (UNK 1-11, 1-12, 1-13, 2-14, 3-15, 4-16, 5-17, 6-17, 7-17, 3-17 et 1-15) correspondant respectivement aux SEQ ID NO: 25-26, 16 et 27-34 est présentée dans le Tableau VIII. L'activité de liaison des peptides, exprimée par la valeur IC₅₀, a été déterminée par le test de liaison en compétition, dans les conditions définies au Tableau VI.

10 **b) détermination des résidus du peptide UNK1 impliqués dans la liaison aux molécules DP4**

15 Des mutants du peptide UNK 3-15 (KYFAATQFEPLAA ; SEQ ID NO: 28) ont été synthétisés ; chaque mutant contient un seul des résidus Y4, F5, T8, Q9, F10, E11, P12, L13 substitué en alanine ou en lysine, le résidu K3 substitué en alanine, ou bien l'un des résidus A6, A7, A14 et A15 substitué en lysine.

20 La séquence de ces peptides (UNK K3A, Y4A, F5A, T8A, Q9A, F10A, E11A, P12A, L13A, Y4K, F5K, A6K, A7K, T8K, Q9K, F10K, E11K, P12K, L13K, A14K et A15K) correspondant respectivement aux séquences SEQ ID NO:35 à 55 est présentée dans le Tableau IX.

25 L'activité de liaison des peptides, exprimée par la valeur IC₅₀, a été déterminée par le test de liaison en compétition, dans les conditions définies au Tableau VI. La perte de liaison des peptides mutants est exprimée par le rapport des IC₅₀ du peptide mutant et du peptide UNK1.

30 **c) détermination des motifs de liaison aux molécules DP401 et DP402**

Les résidus F en P1, T en P4, F en P6 ou L en P9 du peptide UNK1 ont été substitués par l'un des résidus suivants :

30 - P1 : Y, L, E, N, T, D, G, H, I, M, P, Q, R, S, V ou W,
- P4 : F, L, E, D, N, Y, R, S, G, H ou P,
- P6 : Y, L, W, E, N, T, D, G, H, I, M, P, Q, R, S, V, W ou C,

- P9 : F, Y, E, D, N, R, V, G, H, I, P, Q, S, T ou W.

La séquence de ces peptides, correspondant aux séquences SEQ ID NO: 56 à 81 et SEQ ID NO: 96 à 129, est présentée respectivement dans les Tableaux Xa et Xb.

5 La perte de liaison des peptides mutants aux molécules DP4 a été déterminée par le test décrit pour les mutants alanine et lysine.

2) Résultats

a) détermination d'un peptide UNK1 minimum

Les résultats sont présentés dans le Tableau VIII, ci-après :

10 **Tableau VIII** : Liaison à DP401 et DP402 des peptides dérivés de UNK1 (UNK 1-17)

peptides	Positions des séquences																	IC ₅₀ (nM)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	401	402
UNK 1-17	E	K	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A	R	L	11	14
UNK 1-11	E	K	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E							55	95
UNK 1-12	E	K	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P						93	100
UNK 1-13	E	K	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	L					14	28
UNK 2-14	K	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	L	A					15	23
UNK 3-15	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A					19	23
UNK 4-16		Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A	R			38	25	
UNK 5-17			F	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A	R	L		65	38	
UNK 6-17				A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A	R	L	15000		6000	
UNK 7-17					A	T	Q	F	E	P	L	A	A	R	L	15000		12500	
UNK 3-17		K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A	R	L	18	14	
UNK 1-15	E	K	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A			18	17

Les résultats obtenus montrent que :

15 - la perte de liaison observée avec les peptides UNK 1-11, UNK 1-12, UNK 4-16, UNK 5-17 suggère que le peptide minimum à une taille de 13 à 15 acides aminés,

- la perte de liaison observée avec les peptides UNK 6-17 et UNK 7-17 suggère que le résidu F en position 5 est le premier résidu d'ancrage des peptides dans le site de liaison des molécules DP4 (résidu P1).

20 b) détermination des résidus du peptide UNK1 impliqués dans la liaison aux molécules DP4

Les résultats sont présentés dans le Tableau IX, ci-après :

**Tableau IX : Perte de liaison à DP401 et DP402
des mutants alanine et lysine**

5

PEPTIDE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	DP*0401	DP*0402
UNK1	E	K	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A	R	L	1	1,00
UNK 3-15																		1,5	1,7
										<u>P1</u>	<u>P4</u>	<u>P6</u>	<u>P9</u>						
UNK K3A																		0,9	1
UNK Y4A																		1,2	0,9
UNK F5A																		41	5,7
UNK T8A																		0,8	0,8
UNK Q9A																		0,8	0,6
UNK F10A																		336	62
UNK E11A																		0,5	0,5
UNK P12A																		1,2	0,9
UNK L13A																		3,1	2,3
UNK Y4K																		1,2	1
UNK F5K																		569	297
UNK A6K																		1,6	1
UNK A7K																		2	1,2
UNK T8K																		31	3,6
UNK Q9K																		1,6	0,9
UNK F10K																		420	350
UNK E11K																		1,3	0,7
UNK P12K																		1,8	1,4
UNK L13K																		81	70
UNK A14K																		1,7	1,4
UNK A15K																		1,7	1,4

Les résultats montrent une perte de liaison pour F5A, F10A, F5K, F10K et L13K, ce qui suggère fortement que les résidus d'ancre des peptides dans le site de liaison des molécules DP4 sont respectivement la F5 en position P1, la F10 en 10 position P6 et la L13 en position P9.

c) détermination des motifs de liaison aux molécules DP401 et DP402

Les résultats sont présentés dans les Tableaux Xa, Xb et le Tableau XI, ci-après :

Tableau Xa : Perte de liaison à DP401 et DP402*
des mutants en P1, P4, P6 et P9 (SEQ ID NO: 56 à 81)

PEPTIDE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	DP*0401	DP*0402
UNK1	E	K	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A	R	L	1,00	1,00
UNK 3-15			K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A			1,4	1,4
				P1				P4			P6			P9					
UNK F5Y	K	Y	Y	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A				3	3,9	
UNK F5L	K	Y	L	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A				3,6	6	
UNK F5E	K	Y	E	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A				117	123	
UNK F5N	K	Y	N	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A				398	76	
UNK F5T	K	Y	T	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A				234	126	
UNK T8F	K	Y	F	A	A	F	Q	F	E	P	L	A	A				2,7	1,7	
UNK T8L	K	Y	F	A	A	L	Q	F	E	P	L	A	A				1,9	2,6	
UNK T8E	K	Y	F	A	A	E	Q	F	E	P	L	A	A				2,7	3,7	
UNK T8D	K	Y	F	A	A	D	Q	F	E	P	L	A	A				2	2,3	
UNK T8N	K	Y	F	A	A	N	Q	F	E	P	L	A	A				4,1	4,8	
UNK T8Y	K	Y	F	A	A	Y	Q	F	E	P	L	A	A				4,1	2,4	
UNK T8R	K	Y	F	A	A	R	Q	F	E	P	L	A	A				17	6,7	
UNK T8S	K	Y	F	A	A	S	Q	F	E	P	L	A	A				2,7	3,4	
UNK F10Y	K	Y	F	A	A	T	Q	Y	E	P	L	A	A				2,4	3,4	
UNK F10L	K	Y	F	A	A	T	Q	L	E	P	L	A	A				7,2	6,7	
UNK F10W	K	Y	F	A	A	T	Q	W	E	P	L	A	A				2,2	2,5	
UNK F10E	K	Y	F	A	A	T	Q	E	E	P	L	A	A				1405	1190	
UNK F10N	K	Y	F	A	A	T	Q	N	E	P	L	A	A				2460	1809	
UNK F10T	K	Y	F	A	A	T	Q	T	E	P	L	A	A				1171	476	
UNK L13F	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	F	A	A				1,7	4	
UNK L13Y	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	Y	A	A				2	15	
UNK L13E	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	E	A	A				11	8	
UNK L13D	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	D	A	A				9,4	9	
UNK L13N	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	N	A	A				17	10	
UNK L13R	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	R	A	A				64	43	
UNK L13V	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	V	A	A				2,5	1,9	

* les valeurs supérieures à 10 sont indiquées en gras.

Tableau Xb : Perte de liaison à DP401 et DP402*
des mutants en P1, P4, P6 et P9 (SEQ ID NO: 96 à 129)

peptides	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	perte
UNK	E	K	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A	R	L	DP*0401 DP*0402
UNK F5D		K	Y	D	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A			150	57
UNK F5G		K	Y	G	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A			160	55
UNK F5H		K	Y	H	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A			150	36
UNK F5I		K	Y	I	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A			3	2
UNK F5M		K	Y	M	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A			3	3
UNK F5P		K	Y	P	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A			100	48
UNK F5Q		K	Y	Q	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A			260	97
UNK F5R		K	Y	R	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A			140	54
UNK F5S		K	Y	S	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A			160	42
UNK F5V		K	Y	V	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A			11	6
UNK F5W		K	Y	W	A	A	T	Q	F	E	P	L	A	A			0,5	1
UNK T8G		K	Y	F	A	A	G	Q	F	E	P	L	A	A			1	2
UNK T8P		K	Y	F	A	A	P	Q	F	E	P	L	A	A			3	2
UNK T8H		K	Y	F	A	A	H	Q	F	E	P	L	A	A			6	2
UNK F10D		K	Y	F	A	A	T	Q	D	E	P	L	A	A			2700	120
UNK F10G		K	Y	F	A	A	T	Q	G	E	P	L	A	A			>7100	3700
UNK F10H		K	Y	F	A	A	T	Q	H	E	P	L	A	A			2400	220
UNK F10I		K	Y	F	A	A	T	Q	I	E	P	L	A	A			7	6
UNK F10M		K	Y	F	A	A	T	Q	M	E	P	L	A	A			4	1
UNK F10P		K	Y	F	A	A	T	Q	P	E	P	L	A	A			210	12
UNK F10Q		K	Y	F	A	A	T	Q	Q	E	P	L	A	A			>7100	230
UNK F10R		K	Y	F	A	A	T	Q	R	E	P	L	A	A			>7100	370
UNK F10S		K	Y	F	A	A	T	Q	S	E	P	L	A	A			500	33
UNK F10V		K	Y	F	A	A	T	Q	V	E	P	L	A	A			42	22
UNK F10W		K	Y	F	A	A	T	Q	W	E	P	L	A	A			1	1
UNK F10C		K	Y	F	A	A	T	Q	C	E	P	L	A	A			17	2
UNK L13G		K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	G	A	A			15	12
UNK L13H		K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	H	A	A			13	35
UNK L13I		K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	I	A	A			1	3
UNK L13P		K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	P	A	A			9	3
UNK L13Q		K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	Q	A	A			8	2
UNK L13S		K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	S	A	A			9	5
UNK L13T		K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	T	A	A			5	3
UNK L13W		K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	W	A	A			1	13

* les valeurs supérieures à 10 sont indiquées en gras.

Tableau XI : Spécificité de la liaison aux molécules DP4*

		P1		P4		P6		P9	
		+	-	+	-	+	-	+	-
DP*	0401	F,Y,L, I,M,W	H,T,S A,G,P, K,R,D E,N,Q, C, V	F,L,Y, H,T,A, S,G,P, I,M,Q, E,D,N, V,W,C	K,R	F,Y,L, W,I,M	H,V,A G,T,P S,K,R, E,D,N, Q,C	F,Y,V A,I,P, W,L,M Q,S,T, D	H,G, K,R E,N,C
DP*	0402	F,Y,L A,I,M, V,W	H,T,S G,P, K,R,D E,N,Q, C	F,L,Y, H,T,A, S,G,P, I,MQ,E D,N,V, K,W,C, R		F,Y,L, W,I,M C	H,V,A, G,T,P, S,K,R, E,D,N, Q	F,V,A, I,P,L, M,C,Q, S,T,D, E	Y,H, W,G, K,R,N
	-								

* Les acides aminés qui provoquent respectivement une perte de liaison d'un facteur supérieur à 10 et inférieur à 10 sont indiquées dans la colonne (-) et la colonne (+) ; les résidus d'ancrage sont représentés en gras et les différences entre DPB1*0401 et DPB1*0402 sont soulignées.

5

Les résultats obtenus montrent que :

- les poches P1, P6 et P9 du site de liaison des molécules DP4 acceptent des résidus aromatiques et hydrophobes,
- la poche P4 du site de liaison des molécules DP4 est très permis-
10 sive, et dans une moindre mesure la poche P9 qui accepte également les résidus Q, S, T et D, et
 - l'allèle DPB1*0401 accepte un résidu tyrosine ou tryptophane en P9 mais n'accepte pas de résidus cystéine et acide glutamique à cette position, ni de résidus alanine et valine en P1, ni de résidus lysine et arginine en P4 ou bien encore 15 de résidu cystéine en P6 ; l'allèle DPB1*0402 accepte un résidu alanine ou valine en P1, un résidu lysine ou arginine en P4, un résidu cystéine en P6 et un résidu cystéine ou acide glutamique en P9 mais n'accepte pas de résidu tyrosine ou tryptophane à cette position.

d) Identification d'un motif de liaison dans la séquence de peptides ligands de DP4

L'activité de liaison de différents peptides ligands de DP4 a été mesurée par le test de liaison en compétition, dans les conditions définies au Tableau 5 VI. Les résultats sont exprimés par la valeur IC₅₀ (Tableau XIII) ou par la valeur du rapport des IC₅₀ du peptide ligand et du peptide UNK1 (Tableau XII).

Les peptides testés correspondant respectivement aux séquences SEQ ID NO: suivantes, sont présentés dans les tableaux XII et XIII:

- TT 947-963 (SEQ ID NO:20),
- 10 - UNK1 (SEQ ID NO:14),
- NY-ESO1 87-11, 119-143, 158-180, 166-180 (SEQ ID NO:94, 83, 82, 95),
- - UL21 283-302 (SEQ ID NO:18),
- IL3 127-146 (SEQ ID NO:13)
- 15 - NS-P2 (SEQ ID NO:4)
- Api-m1 65-72, 69-86, 73-90, 77-94, 81-98 (SEQ ID NO:85, 88, 89, 17, 86)
- - MAG 245-258 (SEQ ID NO:19)
- MART1 1-20, 41-60, 51-73, 62-72, 103-118 (SEQ ID NO:90, 91, 20 87, 92, 93).

En parallèle, les séquences de ces peptides ligands de DP4 ont été alignées et la présence d'un motif de liaison à DP4 tel que défini au Tableau XI, a été recherchée (Tableaux XII et XIII).

Tableau XII: Alignement des séquences des peptides ligand de DP4

Peptides	Séquences	0401*	0402*
	P1 P6 P9		
TT 947-963	FNN <u>F</u> TVS <u>F</u> WLR <u>V</u> PKVSA	0,57	0,75
UNK1	EKKY <u>F</u> AAAT <u>Q</u> <u>F</u> E <u>P</u> LAARL	1	1
NY-ESO1 158-180	LLM <u>W</u> IT <u>Q</u> <u>C</u> <u>F</u> LP <u>V</u> FLAQPPSGQRR	2	7
UL21 283-302	RE <u>I</u> WWV <u>F</u> <u>Y</u> AG <u>D</u> RALEEPHAE	2,86	2,78
IL3 127-146	GPGAPAD <u>V</u> QYD <u>L</u> <u>Y</u> LN <u>V</u> ANRR	3,98	3,06
NS-p2	GVQIVRQIRSGER <u>F</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>I</u> WSQ	4,69	3,89
NY-ESO1 119-143	PGVLLKE <u>F</u> TVSGN <u>I</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> DHR	12	12
NY-ESO1 119-143	PGV <u>L</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>V</u> SGN <u>I</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> DHR	12	12
NY-ESO1 119-143	PGV <u>L</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u> GN <u>I</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> DHR	12	12
NY-ESO1 87-111	LLE <u>F</u> <u>Y</u> LAMP <u>F</u> <u>A</u> T PMEAE <u>L</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>S</u> LAQ	20	9
Api m1 77-94	TISSY <u>F</u> <u>V</u> GK <u>M</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>I</u> DTK	30	10
Api m1 77-94	TISSY <u>F</u> <u>V</u> GK <u>M</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>I</u> DTK	30	10
Api m1 65-72	DKFYDCLKNSADTSSYF	NT	371,4
MAG 245-258	LL <u>T</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>V</u> QEN <u>Y</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Y</u>	30,2	38,89
MAG 245-258	LL <u>T</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>V</u> QEN <u>Y</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Y</u>	30,2	38,89
Api m1 81-98	YFVGK <u>M</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>I</u> DT <u>K</u> <u>C</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>L</u>	150	70
MART1 51-73	RNGYRA <u>I</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>R</u>	857	414

* 0401: activité relative de liaison des peptides à DPB1* 0401 par rapport au peptide UNK1 (activité de liaison égale à 1)

* 0402: activité relative de liaison des peptides à DPB1* 0402 par rapport au peptide UNK1 (activité de liaison égale à 1)

Tableau XIII: Liaison des peptides Api m1, NY-ESO1 et MART1 à DPB1*0401 et DPB1*0402⁺.

peptides	Sequences	IC ₅₀ (nM)	
		401	402
UNK1	EKKY <u>FAATQF</u> EPLAARL	12	13
Api m1 65-72	DKFYDCLKNSADTISSYF	50000	6500
Api m1 69-86	DCLKNSADTISSYFVGKM	> 10000	> 10000
Api m1 73-90	NSADTISSY <u>FVGKMY</u> FNL	> 10000	> 10000
Api m1 77-94	TISSY <u>FVGKMY</u> FN <u>LIDTK</u>	450	175
Api m1 81-98	<u>YFVGKMY</u> FN <u>LIDTK</u> CYKL	2250	1225
MART1 1-20	MPREDAHFIYGYPKKGHGS	> 10000	> 10000
MART1 41-60	<u>LLIGCWY</u> CRRRNGYRALMDK	> 10000	> 10000
MART1 51-73 ⁺⁺	RRNGYRALMDKSLHVGTQCALTRR	8000	4000
MART1 62-72	LMDKSLHVGTQCALTRRCPQ	> 10000	> 10000
MART1 103-118	AYEKLSAEQSPPPYSP	> 10000	> 10000
NY-ESO1 87-111	<u>LLEFYLAMP</u> FATPMEEAELARRSLAQ	183	83
NY-ESO1 119-143 ^{***}	PGVLLKEFTVSGN <u>ILTIRL</u> T <u>AADHR</u>	110	117
NY-ESO1 158-180	LLM <u>WITQCFLPV</u> FLAQPPSGQRR	20	67
NY-ESO1 166-180	FLPVFLAQPPSGQRR	> 10000	> 10000

⁺ Les acides aminés compatibles avec le motif de liaison aux allèles DPB1*0401 et DPB1*0402 sont indiqués en gras et les motifs de liaison complets sont soulignés.

⁺⁺ La séquence de ce peptide est décrite dans Zarour et al., *PNAS*, 2000, 97, 400-405.

^{***} La séquence de ce peptide est décrite dans Zarour et al., *Cancer Res.*, 2000, 60, 4646-4952.

Les résultats montrent qu'il existe pour la plupart des peptides ligands de DP4 une forte corrélation entre la présence d'au moins 2 résidus P1 et P6 ou P6 et P9 tels que définis au Tableau XI et une affinité élevée pour les molécules DP4 (IC₅₀< 1000nM). Ces résultats montrent également que les résidus les plus importants dans la liaison à HLA-DP4 sont les résidus aromatiques ou hydrophobes en position P1 et P6 ; ces mêmes résidus en position P9 sont moins importants.

EXEMPLE 6 : PREDICTION DE LA SEQUENCE DE PEPTIDES LIGANDS D'HLA-DP4 A PARTIR D'UNE SEQUENCE D'ACIDES AMINES

1) Matériels et méthodes

Une matrice de liaison aux molécules HLA-DP4 a été établie à partir
5 des activités de liaison (IC_{50}) des mutants du peptide UNK 3-15 mesurées par le test de liaison aux molécules DP4 codées par les allèles DPB1*0401 et DPB1*0402, tel que défini ci-dessus, en utilisant comme peptide traceur le peptide UNK 3-15 (exemple 5 et Tableaux IX, Xa, Xb et XI). La contribution de chacun des acides aminés en position P1, P4, P6 et P9 desdits peptides mutants à la liaison aux
10 molécules DP*0401 et DP*0402 est évaluée par un score de liaison correspondant au logarithme (log) du rapport des IC_{50} du peptide mutant et du peptide UNK 3-15. Le score de liaison aux molécules DP*0401 et DP*0402, obtenu pour chacun des acides aminés en position P1, P4, P6 et P9 desdits peptides mutants constitue la matrice de liaison à HLA-DP4 présentée dans le Tableau XIV ci-dessous:

Tableau XIV: Matrice de liaison à HLA-DP4

DP4	Position	Acide aminé																			
		A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	C
DP*0401	P1	1,6	1,7	1,85	0	2,2	2,17	0,48	2,6	0,48	0,48	2,32	1,98	2,41	2,14	2,2	2,15	1,04	0	0,48	2,32
	P4	0	0,3	0,3	0,3	0	0,78	0,3	1,48	0,3	0,3	0,6	0,48	0,3	1,5	0,3	0	0,15	0,3	0,6	0,6
	P6	2,38	3,32	2,9	0	3,85	3,4	0,85	2,43	0,78	0,6	3,15	2,32	3,85	3,85	2,7	2,85	1,62	0,3	0,3	1,23
	P9	0,6	0,85	1,04	0	1,18	1,11	0	1,85	0	0	1,15	0,95	0,9	1,7	0,95	0,6	0,3	0	0,3	1,15
	P1	0,85	1,76	1,85	0	1,76	1,56	0,3	2,28	0,48	0,48	1,78	1,68	1,99	1,72	1,62	1,85	0,78	0	0,48	1,78
DP*0402	P4	0	0,3	0,48	0	0	0,3	0,3	0,7	0,3	0,3	0,6	0,3	0,3	0,7	0,48	0	0,15	0	0	0,6
	P6	1,88	3,85	2,9	0	3,57	2,33	0,78	2,28	0,7	0	3,08	1,08	2,36	2,57	1,52	2,48	1,34	0,3	0,48	0,3
	P9	0,6	0,9	0,9	0,7	1,08	1,54	0,48	1,9	0	0,3	0,85	0,48	0,3	1,6	0,7	0,6	0,3	1,11	1,18	0,85

A partir d'une séquence en acides aminés, la liaison des peptides d'au moins 9 acides aminés inclus dans ladite séquence est calculée à partir de la matrice ci-dessus en effectuant, pour chaque fragment de 9 acides aminés dudit peptide, par exemple des fragments chevauchant de 9 acides aminés couvrant la totalité de cette 5 séquence, la somme des scores de liaison des résidus en position 1, 4, 6 et 9 dudit fragment.

Des peptides présentant des scores de liaison de respectivement 0, 1, 2, 3 et 4 correspondent à des peptides présentant une perte de liaison d'un facteur 1, 10, 100, 1000 et 10000 par rapport au peptide UNK 3-15 (IC_{50} 10 nM), c'est- à -dire, 10 présentant une activité de liaison estimée, de respectivement 10 nM, 100 nM, 1000 nM, 10 μ M. et 100 μ M.

Les peptides présentant les scores de liaison les plus faibles, de préférence inférieur à 2, de manière préférée inférieur à 1, de manière encore plus préférée proche de 0 sont sélectionnés; ces peptides correspondent à ceux dont 15 l'activité de liaison à HLA-DP4, estimée à partir de la matrice de liaison telle que définie ci-dessus, est la plus élevée.

2) Résultats

La corrélation entre le score de liaison des peptides (estimé à l'aide de la matrice de liaison à HLA-DP4, Tableau XIV) et leur affinité pour les molécules 20 HLA-DP4 (mesurée par le test de liaison tel que défini ci-dessus) a été analysée pour 44 peptides étudiés aux exemples 4 et 5.

Les résultats sont illustrés par le Tableau XV et la figure 2.

**Tableau XV: Score de liaison et activité de liaison à HLA-DP4
de différents peptides**

Peptide	DP*0401		DP*0402	
	IC ₅₀ (nM)	score de liaison	IC ₅₀ (nM)	score de liaison
TT 947-963	4,61	0,90	7	1,08
UNK 1	9,47	0,00	10,00	0,00
NY-ESO1 158-180	30,00	0,60	70,00	0,60
UL21 283-302	22,89	1,77	20,00	2,01
IL3 127-146	30,37	1,94	30,00	1,86
NSP2	40,00	2,44	40,00	2,69
NY-ESO1 119-143	100,00	2,16	100,00	1,90
NY-ESO1 87-11	186,12	1,73	87,00	1,26
MAG 245-258	250,00	0,90	400,00	1,68
MART1 51-73	8000,00	3,76	4000,00	2,45
Api-m1 1-18	10000,00	1,89	10000,00	2,08
Api-m1 5-22	10000,00	4,88	10000,00	3,33
Api-m1 9-26	10000,00	3,58	10000,00	3,33
Api-m1 13-30	10000,00	2,92	10000,00	2,38
Api-m1 17-34	10000,00	2,92	10000,00	2,38
Api-m1 21-38	10000,00	4,08	10000,00	3,40
Api-m1 25-42	10000,00	3,97	10000,00	2,64
Api-m1 29-46	10000,00	2,56	10000,00	1,86
Api-m1 33-50	10000,00	2,56	10000,00	1,86
Api-m1 37-54	10000,00	4,00	10000,00	3,07
Api-m1 41-58	10000,00	4,00	10000,00	3,07
Api-m1 45-62	10000,00	3,23	10000,00	2,45
Api-m1 49-66	10000,00	3,23	10000,00	2,45
Api-m1 53-70	10000,00	3,15	10000,00	2,45
Api-m1 57-74	10000,00	3,15	10000,00	2,90
Api-m1 61-78	10000,00	3,15	10000,00	2,90
Api-m1 65-82	50000,00	3,64	6500,00	2,90
Api-m1 69-86	10000,00	2,70	10000,00	1,94
Api-m1 73-90	10000,00	1,78	10000,00	1,18
Api-m1 77-94	450	1,34	175,00	1,18
Api-m1 81-98	2250	1,34	1225,00	0,78
Api-m1 85-102	10000,00	1,71	10000,00	0,78
Api-m1 89-106	10000,00	1,71	10000,00	0,78
Api-m1 93-110	10000,00	4,27	10000,00	3,02
Api-m1 97-114	10000,00	4,98	10000,00	3,46
Api-m1 101-118	10000,00	3,67	10000,00	3,21

Api-m1 105-122	10000,00	3,65	10000,00	3,21
Api-m1 109-126	10000,00	3,65	10000,00	3,44
Api-m1 113-130	10000,00	3,96	10000,00	3,50
Api-m1 117-134	10000,00	1,86	10000,00	1,98
MART1 1-20	10000,00	3,16	10000,00	2,16
MART1 41-60	10000,00	2,48	10000,00	2,20
MART1 62-72	10000,00	4,00	10000,00	2,46
MART1 103-118	10000,00	4,11	10000,00	2,95

Ces résultats montrent qu'il existe une forte corrélation entre le score de liaison et l'affinité des peptides pour HLA-DP4. En effet, en prenant comme seuil d'activité un score de liaison < 2 et une activité de liaison $IC_{50} < 1000$ nM :

5 - 80 % des peptides présentant un score de liaison < 2 pour les molécules HLA-DP4 (DP*0401 et DP*0402) présentent une affinité élevée pour ces molécules ($IC_{50} < 1000$ nM, peptides vrais positifs) et

- 82 % et 76 % des peptides présentant un score de liaison ≥ 2 pour les molécules HLA-DP4 (respectivement DP*0401 et DP*0402) présentent une faible 10 affinité pour ces molécules ($IC_{50} \geq 1000$ nM, peptides vrais négatifs).

En conséquence, la matrice de liaison à HLA-DP4 peut-être utilisée pour prédire la séquence de peptides ligands d'HLA-DP4 à partir de n'importe qu'elle séquence d'acides aminés, notamment une séquence représentant un antigène d'intérêt.

REVENDICATIONS

1°) Procédé de sélection de molécules ligand d'HLA-DP4, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(i) incubation d'HLA-DP4 purifiée avec un traceur constitué par un peptide préalablement marqué et apte à être détecté par un signal approprié, lequel peptide traceur est choisi dans le groupe constitué par les peptides présentant un rapport signal/bruit de fond supérieur à 5, à la concentration de 10 nM, dans un test direct de liaison à HLA-DP4, et répondant à la formule générale (I) $Z_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9Z_2$, dans laquelle :

10 - Z_1 et Z_2 , identiques ou différents, sont nuls ou représentent chacun un peptide de 1 à 100 acides aminés naturels ou synthétiques, de préférence de 1 à 30 acides aminés ; de manière encore plus préférée, de 1 à 10 acides aminés,

- X_6 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe ou bien une cystéine,

15 - X_1 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe et/ou X_9 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe ou bien une cystéine (C), un acide aspartique (D), une glutamine (Q), une sérine (S), une thréonine (T) ou un acide glutamique (E), et

- X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_7 et X_8 représentent chacun un acide aminé naturel ou synthétique,

20 en présence de différentes concentrations de molécule(s) à tester,

(ii) séparation des différents complexes formés,

(iii) révélation des complexes HLA-DP4/peptide traceur par mesure du signal associé audit peptide traceur, et

25 (iv) sélection des molécules ligand qui présentent une activité de liaison $IC_{50} < 1000$ nM, correspondant à la concentration de ces molécules qui inhibent 50 % de la liaison du peptide traceur.

2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdites molécules à tester représentent une banque de peptides chevauchants recouvrant la 30 séquence d'un antigène.

3°) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que l'HLA-DP4 de l'étape i) est choisie dans le groupe constitué par les molécules codées par les allèles DPA1*103/DPB1*0401 et DPA1*103/DPB1*0402.

4°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que dans ledit peptide traceur de formule générale (I) :

- X_6 est sélectionné parmi L, I, W, F, M, Y et C, et

- X_1 est sélectionné parmi A, V, L, I, W, F, M et Y, et/ou X_9 est sélectionné parmi A, V, L, I, P, W, F, M, Y, C, D, Q, S, T et E.

5 5°) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que ledit peptide traceur est choisi dans le groupe constitué par les peptides de séquence SEQ ID NO: 4, 9, 12, 13, 14, 18 et 19.

6°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit peptide traceur est choisi dans le groupe constitué par les peptides biotinylés, radiomarqués et les peptides couplés à un fluorochrome.

10 7°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ledit peptide traceur est utilisé à une concentration < 200 nM, de préférence inférieure à 20 nM ; de manière encore plus préférée à la concentration de 10 nM.

8°) Ligand d'HLA-DP4 susceptible d'être obtenu par le procédé de 20 sélection selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il correspond à une molécule minérale ou à une molécule organique, naturelle ou synthétique, présentant une activité de liaison à HLA-DP4 inférieure à 1000 nM.

9°) Ligand d'HLA-DP4 selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite molécule organique est un peptide ou un peptide modifié tel qu'un glycopeptide, un lipopeptide ou un pseudopeptide.

10°) Peptide ligand d'HLA-DP4 selon la revendication 9, caractérisé en ce que sa séquence peptidique répond à la formule générale (I) $Z_1X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9Z_2$, dans laquelle :

- Z_1 et Z_2 , identiques ou différents, sont nuls ou représentent chacun 30 un peptide de 1 à 100 acides aminés naturels ou synthétiques, de préférence de 1 à 30 acides aminés ; de manière préférée, de 1 à 10 acides aminés,

- X_6 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe, ou bien une cystéine,

5 - X_1 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe et/ou X_9 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe, ou bien une cystéine (C), un acide aspartique (D), une glutamine (Q), une sérine (S), une thréonine (T) ou un acide glutamique (E), et

- X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_7 et X_8 représentent chacun un acide aminé naturel ou synthétique,

10 à condition que ledit peptide ligand d'HLA-DP4, de formule générale (I) ne corresponde à aucune des séquences SEQ ID NO: 1 à 17.

11°) Peptide selon la revendication 10, caractérisé en ce que :

- X_6 est sélectionné parmi L, I, W, F, M, Y et C, et

- X_1 est sélectionné parmi A, V, L, I, W, F, M et Y, et/ou X_9 est sélectionné parmi A, V, L, I, P, W, F, M, Y, C, D, Q, S, T et E.

15 12°) Peptide selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il se lie spécifiquement à la molécule HLA-DPB1*0401 et X_6 est différent de C, et/ou X_1 est différent de A et de V, et/ou X_9 représente W ou Y ou X_9 est différent de E et de C, et/ou X_4 est différent de K et de R.

20 13°) Peptide selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il se lie spécifiquement à la molécule DPB1*0402 et X_6 représente C, et/ou X_1 représente A ou V, et/ou X_9 représente E ou C ou X_9 est différent de Y et W, et/ou X_4 représente K ou R.

14°) Peptide selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il présente la séquence SEQ ID NO:84.

25 15°) Molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle code pour un peptide selon l'une quelconque des revendications 10 à 14.

30 16°) Cassette d'expression, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une molécule d'acide nucléique selon la revendication 15 et les séquences nécessaires au contrôle de la transcription et de la traduction de ladite molécule d'acide nucléique.

17°) Vecteur, caractérisé en ce qu'il comprend un insert constitué par une molécule d'acide nucléique selon la revendication 15 ou une cassette d'expression selon la revendication 16.

18°) Cellule transformée par au moins une molécule d'acide nucléique selon la revendication 15 ou un vecteur selon la revendication 17.

19°) Composition immunomodulatrice, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un ligand d'HLA-DP4 selon l'une quelconque des revendications 8 à 14 ou une molécule d'acide nucléique selon la revendication 15.

20°) Réactif de diagnostic de l'état immunitaire d'un individu, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un ligand d'HLA-DP4 selon l'une quelconque des revendications 8 à 14.

21°) Méthode de diagnostic de l'état immunitaire d'un individu comprenant les étapes de :

- mise en contact d'un échantillon biologique dudit individu avec un réactif de diagnostic selon la revendication 20, et

- détection de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques d'un antigène.

22°) Kit de détection de l'état immunitaire d'un individu, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un réactif selon la revendication 20, associé à un moyen de détection des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques d'un antigène.

23°) Utilisation d'un ligand d'HLA-DP4 selon l'une quelconque des revendications 8 à 14 ou d'une molécule d'acide nucléique selon la revendication 15, pour la préparation d'un médicament immunomodulateur ou d'un réactif de diagnostic de l'état immunitaire d'un individu.

24°) Procédé de tri de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques d'un antigène, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- mise en contact de cellules avec des tétramères marqués par un fluorochrome, préparés à partir des complexes entre un ligand d'HLA-DP4 selon l'une quelconque des revendications 8 à 14 et des molécules HLA-DP4 solubles, et

- tri des cellules liées audit tétramères, en cytométrie de flux.

25°) Procédé d'identification de peptides ligands d'HLA-DP4 selon la revendication 10, à partir d'une séquence d'acides aminés, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

5 a) l'établissement d'une matrice de liaison à HLA-DP4 par calcul, -pour tous les mutants d'un peptide traceur tel que défini à la revendication 1, représentant l'ensemble des substitutions des résidus en position 1, 4, 6 ou 9 dudit peptide traceur par les 19 autres acides aminés naturels-, du rapport des IC₅₀ desdits peptides mutants et dudit peptide traceur, à l'aide du test de liaison à HLA-DP4 tel que défini dans le procédé de sélection de la revendication 1,

10 b) l'évaluation de la liaison à HLA-DP4 de peptides d'au moins 9 acides aminés inclus dans ladite séquence d'acides aminés, par calcul, pour chaque fragment de 9 acides aminés dudit peptide, de la somme des scores de liaison à HLA- DP4 des résidus en position 1, 4, 6 et 9 dudit fragment, à partir de la matrice de liaison établie en a), et

15 c) l'identification des peptides ligands d'HLA-DP4 correspondant à ceux dont la perte de liaison à HLA-DP4, par rapport audit peptide traceur est la plus faible, c'est à dire ceux dont la somme des scores de liaison présente la valeur la plus faible exprimée en logarithme (log) ; de préférence inférieure à 2, de manière préférée inférieure à 1, de manière encore plus préférée, proche de 0.

26°) Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que ledit peptide traceur est le peptide de séquence SEQ ID NO:28.

1/2

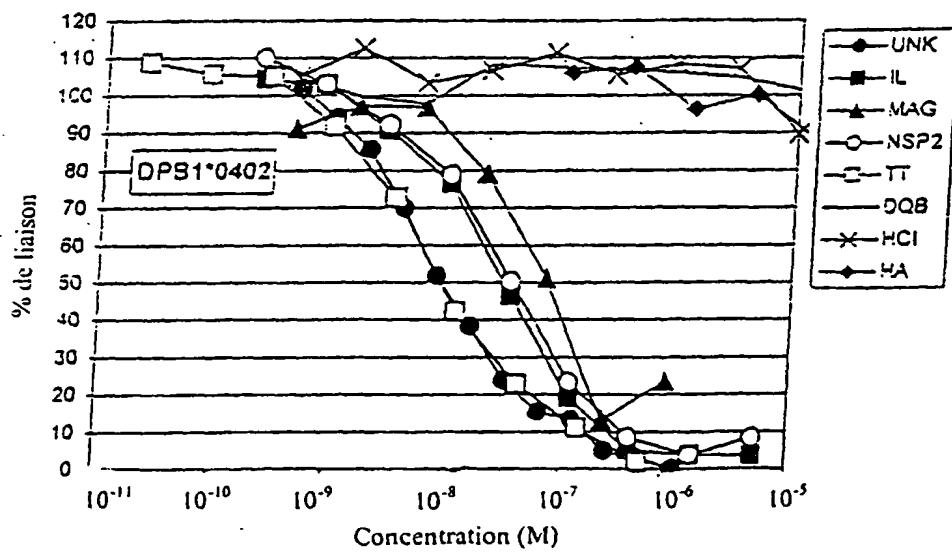
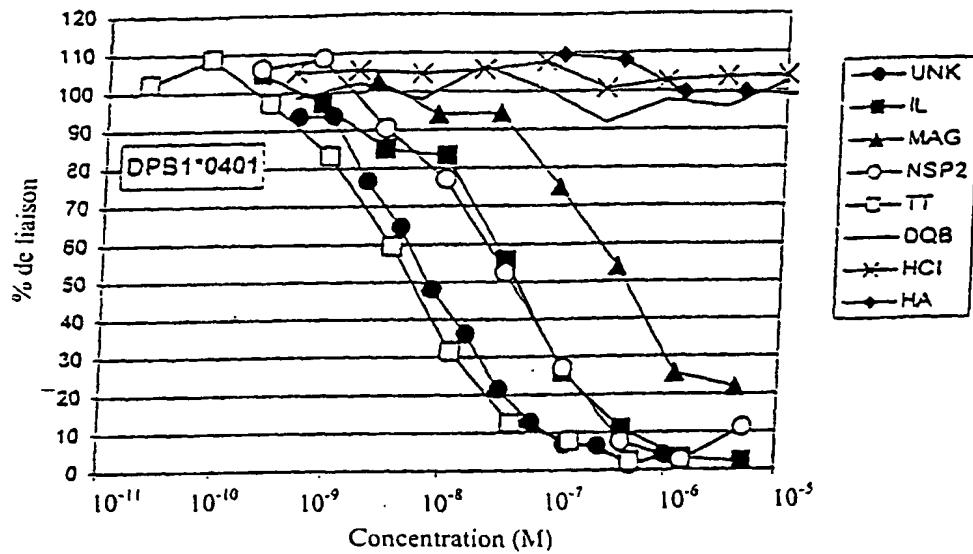
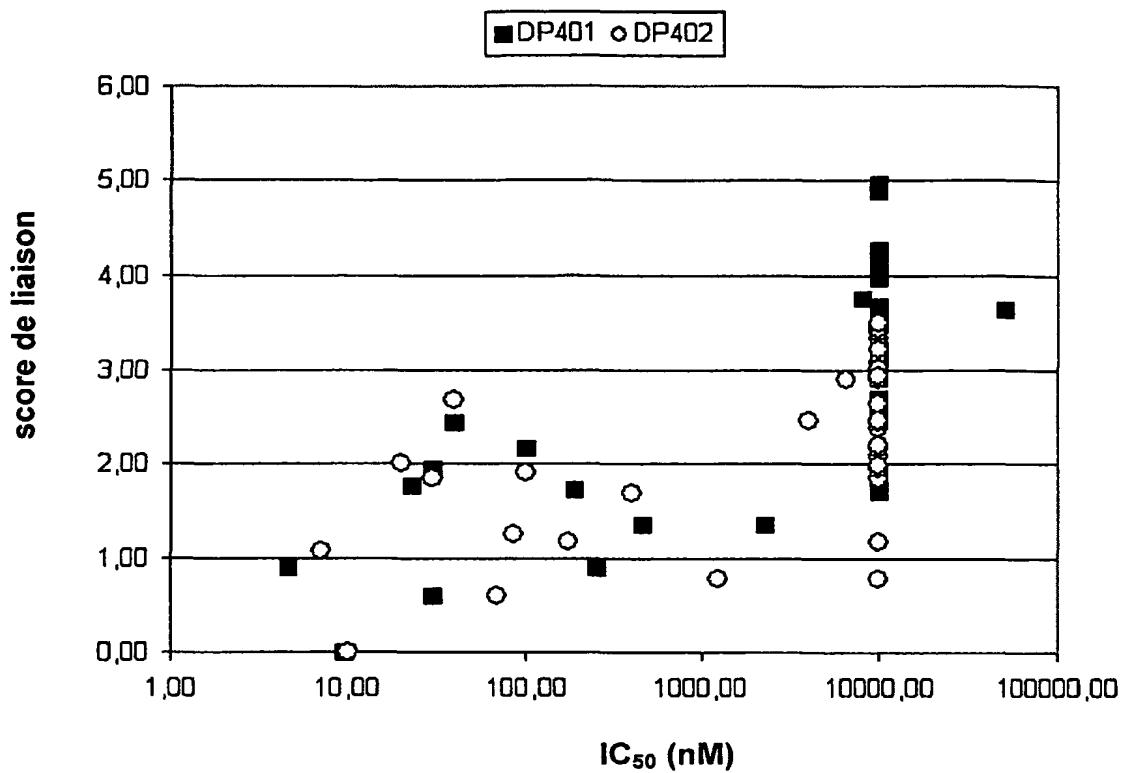


FIGURE 1

2/2

**Figure 2**

LISTE DE SEQUENCES

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
SEDAC THERAPEUTICS
MAILLERE, Bernard
CASTELLI, Florence
BUHOT, Cécile
GEORGES, Bertrand

<120> Procédé de sélection de ligands d'HLA-DP4 et ses applications

<130> sF263ext70

<140>
<141>

<160> 129

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 21-
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 1
Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu
20

<210> 2
<211> 24
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 2
Asp Pro Tyr Asn Cys Asp Trp Asp Pro Tyr His Glu Lys Tyr Asp Trp
1 5 10 15

Asp Leu Trp Asn Lys Trp Cys Asn
20

<210> 3

<211> 10
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 3
Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
1 5 10

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 4
Gly Val Gln Ile Val Arg Gln Ile Arg Ser Gly Glu Arg Phe Leu Lys
1 5 10 15
Ile Trp Ser Gln
20

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 5
Gly Ile Ser Lys Cys Arg Phe Leu Lys Ile Arg Glu Gly Arg
1 5 10

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 6
Ile Ala Phe Asn Ser Gly Met Glu Pro Gly Val Val Ala Glu Lys Val
1 5 10 15

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 7
Gly Met Glu Pro Gly Val Val Ala Glu Lys Val Arg Asn Leu Ser Val
1 5 10 15

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 8
Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro
1 5 10 15

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 9
Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn Tyr Leu Glu Tyr
1 5 10

<210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 10

Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro
1 5 10 15Ser Gly Gln Arg
20

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 11

Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe
1 5 10 15Leu Ala Gln Pro Pro
20

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 12

Arg Glu Leu Trp Trp Val Phe Tyr Ala Gly Asp
1 5 10

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 13

Gly Pro Gly Ala Pro Ala Asp Val Gln Tyr Asp Leu Tyr Leu Asn Val
1 5 10 15

Ala Asn Arg Arg
20

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 14
Glu Lys Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala Arg
1 5 10 15

Leu

-

<210> 15
<211> 16
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 15
Lys Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala Arg Leu
1 5 10 15

-

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 16
Glu Lys Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu
1 5 10

<210> 17
<211> 18
<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<400> 17
Thr Ile Ser Ser Tyr Phe Val Gly Lys Met Tyr Phe Asn Leu Ile Asp
1 5 10 15

Thr Lys

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 18

Arg Glu Leu Trp Trp Val Phe Tyr Ala Gly Asp Arg Ala Leu Glu Glu
1 5 10 15

Pro His Ala Glu
20

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<400> 19

Leu Leu Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn Tyr Leu Glu Tyr
1 5 10

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 20

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

Ala

<210> 21
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 21
Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 22
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 22
Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 23
Asp Val Glu Val Tyr Arg Ala Val Thr Pro Leu Gly Pro Pro Asp
1 5 10 15

<210> 24
<211> 18
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 24
Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp
1 5 10 15

Gln Glu

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 25
Glu Lys Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu
1 5 10

<210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 26
Glu Lys Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro
1 5 10

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 27
Lys Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala
1 5 10

<210> 28
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 28
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 29
Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala Arg
1 5 10

<210> 30
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 30
Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala Arg Leu
1 5 10

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 31
Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala Arg Leu
1 5 10

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 32
Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala Arg Leu
1 5 10

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 33

Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala Arg Leu
1 5 10 15

-

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 34

Glu Lys Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10 15

<210> 35

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<400> 35

Ala Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 36

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 36
Lys Ala Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 37
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 37
Lys Tyr Ala Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 38
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 38
Lys Tyr Phe Ala Ala Ala Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 39
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 39
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Ala Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 40

Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Ala Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 41

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 41

Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Ala Pro Leu Ala Ala
1 5 10

-

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 42

Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Ala Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 43

Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 44
Lys Lys Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 45
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 45
Lys Tyr Lys Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 46
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 46
Lys Tyr Phe Lys Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 47
Lys Tyr Phe Ala Lys Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 48
<211> 13

<210> 52
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 52
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Lys Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 53
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 53
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Lys Ala Ala
1 5 10

<210> 54
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 54
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Lys Ala
1 5 10

<210> 55
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 55
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Lys
1 5 10

<210> 56
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 56

Lys Tyr Tyr Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 57
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 57

Lys Tyr Leu Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 58
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<400> 58

Lys Tyr Glu Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 59
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 59

Lys Tyr Asn Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 60
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 60
Lys Tyr Thr Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 61
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 61
Lys Tyr Phe Ala Ala Phe Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 62
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 62
Lys Tyr Phe Ala Ala Leu Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 63
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 63
Lys Tyr Phe Ala Ala Glu Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 64
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 64
Lys Tyr Phe Ala Ala Asp Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 65
Lys Tyr Phe Ala Ala Asn Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 66
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 66
Lys Tyr Phe Ala Ala Tyr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 67
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 67

Lys Tyr Phe Ala Ala Arg Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 68
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 68
Lys Tyr Phe Ala Ala Ser Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 69
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 69
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Tyr Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 70
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 70
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Leu Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 71
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 71
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Trp Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 72
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 72
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Glu Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 73
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 73
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Asn Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 74
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 74
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Thr Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 75
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 75
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Phe Ala Ala
1 5 10

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 76

Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Tyr Ala Ala
1 5 10

-

<210> 77

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 77

Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Glu Ala Ala
1 5 10

<210> 78

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 78

Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Asp Ala Ala
1 5 10

<210> 79

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 79
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Asn Ala Ala
1 5 10

<210> 80
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 80
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Arg Ala Ala
1 5 10

<210> 81
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 81
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Val Ala Ala
1 5 10

<210> 82
<211> 23
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 82
Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln
1 5 10 15
Pro Pro Ser Gly Gln Arg Arg
20

<210> 83
<211> 25
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 83
Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val Ser Gly Asn Ile Leu Thr
1 5 10 15
Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg
20 25

<210> 84
<211> 25
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 84
Leu Leu Glu Phe Tyr Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala
1 5 10 15
Glu Leu Ala Arg Arg Ser Leu Ala Gln
20 25

<210> 85
<211> 17
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 85
Asp Lys Phe Tyr Asp Cys Leu Lys Asn Ser Ala Asp Thr Ser Ser Tyr
1 5 10 15
Phe

<210> 86
<211> 18

<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 86

Tyr Phe Val Gly Lys Met Tyr Phe Asn Leu Ile Asp Thr Lys Cys Tyr
1 5 10 15

Lys Leu

<210> 87

<211> 23

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 87

Arg Asn Gly Tyr Arg Ala Leu Met Asp Lys Ser Leu His Val Gly Thr
1 5 10 15

Gln Cys Ala Leu Thr Arg Arg
20

<210> 88

<211> 18

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 88

Asp Cys Leu Lys Asn Ser Ala Asp Thr Ile Ser Ser Tyr Phe Val Gly
1 5 10 15

Lys Met

<210> 89

<211> 18

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

Leu Met Asp Lys Ser Leu His Val Gly Thr Gln Cys Ala Leu Thr Arg
1 5 10 15

Arg Cys Pro Gln
20

<210> 93
<211> 16
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 93
Ala Tyr Glu Lys Leu Ser Ala Glu Gln Ser Pro Pro Pro Tyr Ser Pro
1 5 10 15

-

<210> 94
<211> 25
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 94
Leu Leu Glu Phe Tyr Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala
1 5 10 15

Glu Leu Ala Arg Arg Ser Leu Ala Gln
20 25

<210> 95
<211> 15
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 95
Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser Gly Gln Arg Arg
1 5 10 15

<210> 96

<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 96
Lys Tyr Asp Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 97
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 97
Lys Tyr Gly Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 98
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 98
Lys Tyr His Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 99
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 99
Lys Tyr Ile Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 100
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 100
Lys Tyr Met Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 101
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 101
Lys Tyr Pro Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 102
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 102
Lys Tyr Gln Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 103
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 103
Lys Tyr Arg Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 104
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 104
Lys Tyr Ser Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 105
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 105
Lys Tyr Val Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 106
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 106
Lys Tyr Trp Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 107
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 107

Lys Tyr Phe Ala Ala Gly Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 108
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 108
Lys Tyr Phe Ala Ala Pro Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 109
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 109
Lys Tyr Phe Ala Ala His Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 110
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 110
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Asp Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 111
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 111
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Gly Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 112
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 112
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln His Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 113
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 113
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Ile Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 114
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide
synthétique

<400> 114
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Met Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 115
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 115
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Pro Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 116
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 116
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Gln Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 117
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 117
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Arg Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 118
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 118
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Ser Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 119
<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 119

Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Val Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 120

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 120

Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Trp Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 121

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 121

Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Cys Glu Pro Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 122

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 122

Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Gly Ala Ala
1 5 10

<210> 123
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 123
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro His Ala Ala
1 5 10

<210> 124
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 124
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Ile Ala Ala
1 5 10

<210> 125
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 125
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Pro Ala Ala
1 5 10

<210> 126
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 126
Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Gln Ala Ala
1 5 10

<210> 127

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 127

Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Ser Ala Ala
1 5 10

<210> 128

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 128

Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Thr Ala Ala
1 5 10

<210> 129

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:peptide synthétique

<400> 129

Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Trp Ala Ala
1 5 10

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international**



**(43) Date de la publication internationale
15 mai 2003 (15.05.2003)**

PCT

**(10) Numéro de publication internationale
WO 03/040299 A3**

**(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/68, C12N 15/00**

**(74) Mandataire : CABINET ORES; 36, rue de St. Peters-
bourg, F-75008 Paris (FR).**

**(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/03555**

**(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.**

**(22) Date de dépôt international :
17 octobre 2002 (17.10.2002)**

**(25) Langue de dépôt :
français**

**(26) Langue de publication :
français**

**(30) Données relatives à la priorité :
01/13352 17 octobre 2001 (17.10.2001) FR**

**(84) États désignés (regional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).**

**(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : COM-
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR];
31-33 rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR). SEDAC
THERAPEUTICS [FR/FR]; Parc Eurasanté, Le Galénis -
Bâtiment B, 85 rue Nelson Mandela, F-59120 Loos (FR).**

**Publiée :
— avec rapport de recherche internationale**

(72) Inventeurs; et

**(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
MAILLERE, Bernard [FR/FR]; 1 Promenade Vénégia,
F-78000 Versailles (FR). CASTELLI, Florence [FR/FR];
17/19 rue Paul Bert, F-92120 Montrouge (FR). BUHOT,
Cécile [FR/FR]; 76 rue de Choisy, F-94400 Vitry-sur-Seine
(FR). GEORGES, Bertrand [FR/FR]; 36 Clos de la
Ferme, F-59221 Bauvin (FR).**

**(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 27 novembre 2003**

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD OF SELECTING HLA-DP4 LIGANDS AND THE APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre : PROCEDE DE SELECTION DE LIGANDS D'HLA-DP4

(57) Abstract: The invention relates to a method of selecting HLA-DP4 ligand molecules comprising the following steps: (i) incubation of purified HLA-DP4 with a tracer having general formula (I) $Z_1X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9Z_2$ (wherein Z_1 and Z_2 , which may be identical or different, are equal to zero or each represent a peptide with between 1 and 100 amino acids; X_6 represents an aromatic or hydrophobic amino acid or a cysteine; and X_1 represents an aromatic or hydrophobic amino acid and/or X_9 represents an aromatic or hydrophobic amino acid or C, D, Q, S, T or E; and X_2, X_3, X_4, X_5, X_7 and X_8 each represent an amino acid) in the presence of different concentrations of molecule(s) to be tested; (ii) separation of the different complexes formed; (iii) detection of HLA-DP4/peptide tracer complexes; and (iv) selection of ligand molecules having a binding capacity $IC_{50} < 1000$ nM. The invention also relates to the applications of same.

WO 03/040299 A3

(57) Abrégé : Procédé de sélection de molécules ligand d'HLA-DP4 comprenant les étapes suivantes: (i) incubation d'HLA-DP4 purifiée avec un traceur de formule générale (I) $Z_1X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9Z_2$, dans laquelle: Z_1 et Z_2 , identiques ou différents, sont nuls ou représentent chacun un peptide de 1 à 100 acides aminés, X_6 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe ou bien une cystéine, et X_1 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe et/ou X_9 représente un acide aminé aromatique ou hydrophobe, ou bien C, D, Q, S, T ou E, et X_2, X_3, X_4, X_5, X_7 et X_8 représentent chacun un acide aminé, en présence de différentes concentrations de molécule(s) à tester, (ii) séparation des différents complexes formés, (iii) révélation des complexes HLA-DP4/peptide traceur, et (iv) sélection des molécules ligand qui présentent une activité de liaison $IC_{50} < 1000$ nM, et ses applications.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 02/03555

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/68 C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZAROUR HASSANE M ET AL: "NY-ES0-1 encodes DRB1*0401-restricted epitopes recognized by melanoma-reactive CD4+ T cells." CANCER RESEARCH, vol. 60, no. 17, 1 septembre 2000 (2000-09-01), pages 4946-4952, XP002236092 ISSN: 0008-5472 abstract table 1 ---- -/--	8-24

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 April 2003 (15.04.03)

Date of mailing of the international search report

06 May 2003 (06.05.03)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 02/03555

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CARBALLIDO JOSE M ET AL: "T cell epitope specificity of human allergic and nonallergic subjects to bee venom phospholipase A2." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 150, no. 8 PART 1, 1993, pages 3582-3591, XP002238429 ISSN: 0022-1767 abstract figure 3	8-24
A	FALK KIRSTEN ET AL: "Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules." IMMUNOGENETICS, vol. 39, no. 4, 1994, pages 230-242, XP008007529 ISSN: 0093-7711 cited in the application abstract figure 4	1-7, 25, 26
A	MARSHALL KEITH W ET AL: "Role of the polymorphic residues in HLA-DR molecules in allele-specific binding of peptide ligands." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 152, no. 10, 1994, pages 4946-4957, XP002212882 ISSN: 0022-1767 cited in the application page 4947, column 2, paragraph 1	1-7, 25, 26
T	CASTELLI FLORENCE A ET AL: "HLA-DP4, the most frequent HLA II molecule, defines a new supertype of peptide-binding specificity." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 169, no. 12, 15 December 2002 (2002-12-15), pages 6928-6934, XP002238415 ISSN: 0022-1767 the whole document	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 02/03555

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos. 8-24 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 5.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple Inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

Claims 8-24

Claims 8-24 relate to a molecule defined by reference to two desirable properties: an ability to be obtained by means of the selection method of claims 1-7, and an HLA-DP4 binding activity of less than 1000 nM, with the exception of the peptides corresponding to sequences 1-17. Of all the molecules having these properties, the patent application provides support within the meaning of PCT Article 6 and/or disclosure within the meaning of PCT Article 5 only for the peptides corresponding to sequences 82, 83, 86 and 94. Sequence 84 claimed in claim 14 is identical to sequence 94. As a result, the search has been restricted to peptides 82, 83, 86 and 94.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De Internationale No
PCT/FR 02/03555A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/68 C12N15/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ZAROUR HASSANE M ET AL: "NY-ESO-1 encodes DRB1*0401-restricted epitopes recognized by melanoma-reactive CD4+ T cells." CANCER RESEARCH, vol. 60, no. 17, 1 septembre 2000 (2000-09-01), pages 4946-4952, XP002236092 ISSN: 0008-5472 abrégé tableau 1 --- -/-	8-24

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 avril 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06/05/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Pellegrini, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Df Internationale No
PCT/FR 02/03555

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CARBALLIDO JOSE M ET AL: "T cell epitope specificity of human allergic and nonallergic subjects to bee venom phospholipase A2." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 150, no. 8 PART 1, 1993, pages 3582-3591, XP002238429 ISSN: 0022-1767 abrégé figure 3 ---	8-24
A	FALK KIRSTEN ET AL: "Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules." IMMUNOGENETICS, vol. 39, no. 4, 1994, pages 230-242, XP008007529 ISSN: 0093-7711 cité dans la demande abrégé figure 4 ---	1-7, 25, 26
A	MARSHALL KEITH W ET AL: "Role of the polymorphic residues in HLA-DR molecules in allele-specific binding of peptide ligands." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 152, no. 10, 1994, pages 4946-4957, XP002212882 ISSN: 0022-1767 cité dans la demande page 4947, colonne 2, alinéa 1 ---	1-7, 25, 26
T	CASTELLI FLORENCE A ET AL: "HLA-DP4, the most frequent HLA II molecule, defines a new supertype of peptide-binding specificity." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 169, no. 12, 15 décembre 2002 (2002-12-15), pages 6928-6934, XP002238415 ISSN: 0022-1767 le document en entier ---	1-26

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Inde internationale n°
PCT/FR 02/03555

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications n°s se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

2. Les revendications n°s 8-24 se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:

voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210

3. Les revendications n°s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétendent ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.

3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s

4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s

Remarque quant à la réserve

Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.

Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 8-24

Les revendications 8-24 se réfèrent à une molécule définie en faisant référence à deux propriétés souhaitables: la susceptibilité d'être obtenue par le procédé de sélection des revendications 1-7, et une activité de liaison à HLA-DP4 inférieure à 1000 nM, avec l'exclusion des peptides correspondant aux séquences 1-17. Des toutes les molécules ayant ces propriétés, la demande de brevet ne donne un fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'article 5 PCT que pour les peptides correspondant aux séquences 82, 83, 86 et 94. La séquence 84, revendiquée dans la revendication 14, est identique à la séquence 94. Par conséquent, la recherche a été limitée aux peptides 82, 83, 86 et 94.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.